

UNIVERSITÉ PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE 425 :
INNOVATION THÉRAPEUTIQUE : DU FONDAMENTAL À L'APPLIQUÉ

Laboratoire d'Etudes et de Recherches en Immunoanalyse

THÈSE DE DOCTORAT

MICROBIOLOGIE

par

Jérôme LAPORTE

Nouveaux anticorps monoclonaux contre les <i>Yersinia</i> pour le diagnostic et l'immunothérapie
--

Date de soutenance : 04/11/2014

Composition du jury :

Directeur de thèse :

Stéphanie SIMON

Chef de laboratoire, CEA Saclay

Rapporteurs :

Christian FORESTIER
Michel SIMONET

Professeur d'Université, Clermont-Ferrand
Professeur d'Université, Lille

Examineurs :

Elisabeth CARNIEL
Anne COLLIGNON

Chef d'unité, Institut Pasteur Paris
Professeur d'Université, Châtenay-Malabry

En préambule, je souhaitais adresser mes remerciements les plus sincères aux personnes qui m'ont apporté leur aide et qui ont contribué à l'élaboration de ce mémoire ainsi qu'à la réussite de ces formidables années universitaires.

Mes premiers remerciements vont aux membres du jury, le Professeur Anne Collignon, le Professeur Christiane Forestier, le Docteur Elisabeth Carniel, et le Professeur Michel Simonet qui me font l'honneur de juger mon travail.

Je remercie sincèrement Stéphanie Simon, qui a dirigé ma thèse et a toujours été présente. Je n'aurais pas pu avoir meilleure directrice de thèse que ce soit sur le plan scientifique, professionnel mais aussi personnel. Merci Stéphanie.

Je remercie Christophe Créminon qui m'a permis de réaliser une thèse de sciences dans de si bonnes conditions durant trois années (mais au fin fond de l'Île-de-France !). Je remercie Hervé Volland, qui fut mon directeur de thèse durant ma première année mais qui a toujours été présent jusqu'à la fin.

Je remercie tout le personnel, permanent ou de passage, du LERI et du LIAA avec qui j'ai construit des liens durant ces trois belles années. Je ne peux pas dresser une liste exhaustive mais merci à tous pour votre aide et vos conseils toujours avisés. Je remercie plus particulièrement celles et ceux qui m'ont épaulé sur mon travail scientifique : la super équipe des anticorps monoclonaux, Patricia, Karine et Marc, et un petit bout de l'équipe immunoanalyse avec Audrey, Céline, Delphine, Julie, Marie-Claire, Mélanie et Hervé « Boubou » (mon compatriote cantalien qui avait déjà immunisé tout le laboratoire contre nos particularités météorologiques et linguistiques). Merci à tous pour votre aide et votre travail. Enfin un grand merci (tänan) à ma co-thésarde Ingrid qui a supporté quotidiennement mes humeurs (ou le contraire ?).

Je remercie également tout le personnel de l'Unité des *Yersinia* à l'Institut Pasteur de Paris, et plus particulièrement le Dr Elisabeth Carniel qui a permis mon intronisation dans le monde des *Yersinia* et qui m'a permis de bénéficier d'une belle collaboration. Je remercie les pasteuriens Karine Anger, Sofia Filali, Christian Demeure et Cyril Savin pour leur travail et nos échanges toujours instructifs.

Enfin Je remercie mes amis aurillacois, clermontois et parisiens qui ont toujours eu un regard intéressé sur cet étrange univers qu'est une thèse : Anne-Claire, Marion, Marité, Mélody, Bécher, Duch, Cyril, Eric, Loïc (qui a réalisé certaines illustrations présentes dans ce manuscrit) et Manu.

Enfin, je remercie mes parents, ma sœur Amandine et Elise, qui est arrivée dans ma vie cette dernière année. Sans vous je ne serais jamais arrivé là.

« Vous vous étonnerez peut-être que ce microbe, qui a à son actif la mort de millions d'hommes, soit considéré par les spécialistes comme un être chétif et délicat ». Élie Metchnikoff, 1897.

Nouveaux anticorps monoclonaux contre les *Yersinia* pour le diagnostic et l'immunothérapie

Trois bactéries du genre *Yersinia* sont pathogènes pour l'homme : *Yersinia pestis* (bacille de la peste), et les bactéries entéropathogènes *Yersinia pseudotuberculosis* et *Yersinia enterocolitica*. *Yersinia pestis* est responsable de plus de 20 000 cas humains de peste déclarés à l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) ces dix dernières années dans différents foyers en Afrique, Asie et Amériques. Considérée aujourd'hui à tort comme une maladie du passé, elle est au contraire classée parmi les maladies réémergentes. Même si elle ne se présente plus sous la forme d'épidémies massives, elle pose encore au monde actuel d'importants défis de par son extrême gravité, sa rapidité de dissémination, une apparition de résistances aux antibiotiques et une éventuelle utilisation terroriste du bacille. Dans ce contexte, l'immunothérapie contre *Y. pestis* pourrait être une bonne alternative pour traiter la peste bubonique et pulmonaire. Un des objectifs de cette thèse était de produire des anticorps monoclonaux murins contre trois protéines de l'injectisome (YscF, YscC et LcrV), un facteur de virulence clé des *Yersinia*. Les anticorps obtenus ont été caractérisés et pour certains leurs épitopes identifiés. Par la suite, en collaboration avec Elisabeth Carniel à l'Institut Pasteur, leur pouvoir neutralisant a été évalué *in vivo* dans un modèle murin de peste bubonique. Ces mêmes anticorps monoclonaux, produits contre les protéines de l'injectisome sont en cours d'évaluation pour la mise au point d'un test de diagnostic rapide de *Y. pestis* dans différents fluides et échantillons biologiques.

Yersinia pseudotuberculosis et *Yersinia enterocolitica* sont présentes dans le monde entier et sont transmises par contamination à partir de viande de porc mal cuite, de lait ou produits laitiers et de végétaux, ou par contact avec des animaux porteurs sauvages ou domestiques. Une transmission interhumaine par voie fécale-orale est également possible. Ces bactéries sont responsables très fréquemment d'infections entériques. Cependant leur recherche dans les coprocultures n'est pas réalisée de façon systématique en laboratoires d'analyses médicales du fait de leur croissance lente et difficile sur les milieux usuels, ce qui rend leur isolement à partir de fèces difficile. De plus, les procédures de routine sont coûteuses et longues. Cela entraîne probablement une sous-estimation de l'incidence des infections à *Yersinia* entéropathogènes, la prescription de traitements non adaptés et la réalisation d'appendicectomies non nécessaires, d'où la nécessité de développer des tests de diagnostic rapides, spécifiques, sensibles et faciles à utiliser. Un des objectifs de cette thèse était de produire un panel d'anticorps monoclonaux murins contre les principaux biotypes et sérotypes pathogènes de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* pour le développement de tests de diagnostic immunologiques (ELISA et tests bandelettes) répondant aux caractéristiques recherchées et utilisables directement avec des échantillons biologiques humains.

Mots clés : Anticorps monoclonaux, *Yersinia*, diagnostic, immunothérapie.

New monoclonal antibodies against *Yersinia* for diagnosis and immunotherapy.

Three bacteria of the genus *Yersinia* are pathogenic for the human: *Yersinia pestis* (the plague bacillus) and the enteropathogenic bacteria: *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica*. *Yersinia pestis* is responsible for more than 20,000 human cases of plague declared to the World Health Organization (WHO) during the ten last years in different areas from Africa, Asia and America. Mistakenly considered today as a disease from the past, on the contrary, the plague is re-emerging. Even if it doesn't occur as a massive epidemic, it still lays down a challenge to the world for its important severity, its quick spreading, the appearance of antimicrobial resistance and a potential use for terrorism. Under the circumstances, the immunotherapy against *Y. pestis* could be a good option to treat bubonic and pneumonic plague. One the aims of this thesis was to produce murine monoclonal antibodies against the three proteins of the injectisome (YscF, YscC, LcrV), a key virulence factor of *Yersinia*. The obtained antibodies were characterized and for certain, the epitopes were identified. Then, in collaboration with Elisabeth Carniel from Institut Pasteur, their therapeutic effect was evaluated *in vivo* with a bubonic plague model in mice. The antibodies generated against the proteins from the injectisome are now evaluated in a diagnosis test for a fast detection of *Y. pestis* in different biological samples.

Yersinia enterocolitica and *Yersinia pseudotuberculosis*, the two enteropathogenic *Yersinia* species for humans, have a worldwide distribution and are among the most frequent agents of human diarrhea in temperate and cold countries. However, research of enteropathogenic *Yersinia* is not consistently performed in medical laboratories because of their specific growth characteristics, which makes their isolation from the stool samples difficult. Moreover, current procedures for isolation are expensive and time consuming, which leads to underestimation of the incidence of yersiniosis and prescriptions of inappropriate antibiotic treatments. One the aims of this thesis was to produce different murine monoclonal antibodies against the main pathogenic biotypes and serotypes of *Y. pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* for the development of fast, sensitive, specific and easy-to-use immunoassays (ELISA and dipsticks), useful for both human and veterinary diagnosis.

Key words: Monoclonal antibody, *Yersinia*, diagnosis, immunotherapy.

Laboratoire de rattachement
CEA de Saclay, DSV/iBiTec-S/SPI
Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunoanalyse
91191 Gif sur Yvette Cedex

Ecole Doctorale : Innovation thérapeutique
Pôle : Microbiologie et thérapeutique anti-infectieuse
Centre d'Études pharmaceutiques
5 rue Jean-Baptiste Clément
92296 Châtenay-Malabry Cedex

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES	7
LISTE DES FIGURES	11
LISTE DES TABLEAUX	13
ABRÉVIATIONS	14
INTRODUCTION GÉNÉRALE	15
I. LE GENRE <i>YERSINIA</i>	15
1. <i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	15
1.1 L'historique	15
1.2 Le cycle infectieux et les réservoirs	16
1.3 L'importance des <i>Yersinia</i> entéropathogènes en médecine vétérinaire	18
1.3.1 <i>Yersinia enterocolitica</i>	18
1.3.2 <i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	19
1.4 L'épidémiologie	20
1.5 La physiopathologie	22
1.6 Les manifestations cliniques	23
1.7 Le diagnostic	24
1.7.1 Le diagnostic bactériologique classique	25
1.7.2 Les autres méthodes de détection	26
1.8 Les traitements des yersiniozes	28
1.8.1 L'antibiothérapie	28
1.8.2 L'antibiorésistance	28
1.9 Le coût économique des yersiniozes	29
2. Le bacille de la peste : <i>Yersinia pestis</i>	30
2.1 L'historique	30
2.1.1 La première pandémie : la peste de Justinien	30
2.1.2 La deuxième pandémie : la peste noire	31
2.1.3 La troisième pandémie et Alexandre Yersin	32
2.2 Le cycle infectieux, les réservoirs et les vecteurs	34
2.2.1 Le cycle infectieux naturel de la peste	34
2.2.2 La dissémination de la peste à l'homme	36
2.2.3 Les animaux hôtes	38
2.2.4 Les animaux vecteurs : les puces	39
2.2.5 Les foyers de peste	39
2.3 L'épidémiologie et la répartition de la peste	40
2.3.1 L'épidémiologie	40
2.3.2 La réémergence	43
2.4 La physiopathologie	43
2.5 Les manifestations cliniques	44
2.5.1 La peste bubonique	44
2.5.2 La peste septicémique	44
2.5.3 La peste pulmonaire	45
2.5.4 La peste pharyngée et la peste méningée	46
2.6 Le diagnostic	46
2.7 Le traitement antibiotique de la peste	48
2.7.1 L'antibiothérapie	48
2.7.2 L'antibiorésistance	49
2.8 <i>Yersinia pestis</i> comme arme bactériologique	49
II. L'ÉMERGENCE DES <i>YERSINIA</i> ET LES FACTEURS DE VIRULENCE	51
1. L'émergence des <i>Yersinia</i> pathogènes	51
2. Le plasmide pYV	52
1.1 Le système de sécrétion de type III	52

1.2	D'autres gènes du plasmide pYV	55
3.	L'Îlot de Haute Pathogénicité	56
4.	Les loci <i>hms</i> et <i>gmhA</i>	57
5.	Les adhésines chromosomiques	57
6.	L'acquisition horizontale de gènes chez <i>Yersinia pestis</i>	58
7.	Les gènes inactivés chez <i>Yersinia pestis</i>	59
8.	L'évolution du pouvoir pathogène de <i>Yersinia pestis</i>	60
III.	LES ANTICORPS CONTRE LES <i>YERSINIA</i>	60
1.	Les anticorps contre <i>Yersinia pestis</i>	60
1.1.	La vaccination	60
1.2.	L'immunothérapie	61
1.3.	Le mécanisme d'action des anticorps anti-injectisome	64
1.4.	La nécessité de développer la sérothérapie contre <i>Yersinia pestis</i>	64
2.	Les anticorps contre <i>Yersinia entéro-pathogènes</i>	65
2.1.	L'utilisation d'anticorps pour la détection des <i>Yersinia entéro-pathogènes</i>	65
2.2.	La nécessité de développer la détection des <i>Yersinia entéro-pathogènes</i>	66
	OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE	69
	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	71
I.	LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE UTILISÉ	71
1.	Les bactéries	71
2.	Les anticorps	74
II.	L'OBTENTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	75
1.	L'immunisation des souris	75
2.	L'obtention des hybridomes par fusion	75
3.	L'obtention des anticorps monoclonaux dans le liquide d'ascite et isotypage	76
III.	LE CLONAGE DES GÈNES YSCC, YSCF ET LCRV	76
1.	L'extraction de l'ADN plasmidique	76
2.	L'amplification de l'ADN par PCR	76
3.	La préparation des produits de PCR et du vecteur pET-22b(+)	77
4.	Le clonage dans le vecteur pET-22b(+) et la transformation des bactéries compétentes	77
5.	Le criblage des clones de bactéries recombinantes	78
6.	La purification et la vérification des plasmides recombinants	78
IV.	LA PRODUCTION DES PROTÉINES RECOMBINANTES YSCC, YSCF ET LCRV	78
1.	Le test de contrôle d'expression avec induction à l'IPTG	78
2.	La préparation des corps d'inclusion	79
3.	La purification des protéines recombinantes possédant l'étiquette poly-histidine par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel	79
V.	LES ANALYSES BIOCHIMIQUES	80
1.	La purification d'anticorps monoclonaux par chromatographie d'affinité sur protéine A	80
2.	L'analyse SDS-PAGE et l'immunoblot	80
3.	La détermination des épitopes de reconnaissance des anticorps	81
VI.	LES DOSAGES IMMUNOMÉTRIQUES	82
1.	La préparation des tests immuno-enzymatiques	82
1.1.	Les tampons et le matériel utilisé	82
1.2.	La préparation des phases solides	82
1.3.	Les traceurs	82
2.	Les tests immuno-enzymatiques	84
2.1.	Les tests ELISA	84
2.2.	Les tests immunométriques à deux sites (appelés aussi dosage sandwich ou ELISA sandwich)	86
2.3.	Le test immuno-enzymatique optimisé	86
3.	Les tests immuno-chromatographiques (ou tests bandelettes)	87
3.1.	La préparation des bandelettes	87
3.2.	La préparation des anticorps traceurs couplés à l'or colloïdal	88

3.3.	La réalisation du test immuno-chromatographique	88
4.	La détection dans des matrices biologiques artificiellement contaminées	89
VII.	LES TESTS <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	90
1.	Les tests <i>in vitro</i> de neutralisation de <i>Y. pestis</i>	90
2.	Les tests <i>in vivo</i> de protection des anticorps monoclonaux	91
	RÉSULTATS.....	93
	PARTIE I : LES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE III DE <i>YERSINIA PESTIS</i>	93
I.	LA PRODUCTION ET LA CARACTERISATION DES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGES CONTRE LE SYSTEME DE SECRETION DE TYPE III	93
1.	Le choix des antigènes	93
2.	La production et le criblage des anticorps monoclonaux	94
3.	La recherche des épitopes	98
3.1.	L'immunoblot avec la protéine recombinante	98
3.2.	La caractérisation des épitopes de reconnaissance des anticorps	99
4.	La reconnaissance des cibles par des anticorps monoclonaux en <i>ELISA</i>	101
5.	Tests de réactions croisées avec différentes préparations de protéines recombinantes	102
6.	La nouvelle tentative de production d'anticorps monoclonaux anti- <i>YscC</i>	103
7.	Bilan et discussion	104
II.	LES ANALYSES COMBINATOIRES.....	106
1.	Les analyses combinatoires des anticorps monoclonaux anti- <i>LcrV</i>	106
2.	Les analyses combinatoires des anticorps monoclonaux anti- <i>YscF</i>	109
3.	Bilan et discussion	110
III.	LA SEROTHERAPIE	110
1.	Les tests <i>in vitro</i> de neutralisation de <i>Y. pestis</i> par les anticorps monoclonaux.....	111
1.1.	La mise au point	111
1.2.	La réalisation	111
2.	Les tests <i>in vivo</i> de protection avec les anticorps monoclonaux.....	112
2.1.	Les anticorps monoclonaux anti- <i>LcrV</i>	112
2.2.	Les anticorps monoclonaux anti- <i>YscF</i>	113
3.	Bilan et discussion	114
IV.	LES TESTS DE DIAGNOSTIC IMMUNOMETRIQUES	115
1.	Les tests immuno-enzymatiques <i>EIA</i>	115
1.1.	L'optimisation du dosage immunométrique à deux sites (<i>EIA</i>)	115
1.2.	La détection des protéines recombinantes par ajout dans des matrices biologiques	118
2.	Les tests immuno-chromatographiques	120
2.1.	Les analyses combinatoires en bandelettes.....	120
2.2.	La détection des protéines recombinantes par ajout dans des matrices biologiques	123
3.	Discussions et perspectives	124
	PARTIE II : DÉVELOPPEMENT DE TESTS RAPIDES POUR LA DÉTECTION DES <i>YERSINIA</i> ENTÉROPATHOGENES	127
I.	LA PRODUCTION ET LA SELECTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX	127
1.	Le choix des antigènes	127
2.	La première campagne d'immunisation	127
2.1.	La production et la sélection des hybridomes	127
2.2.	Les analyses combinatoires.....	132
3.	La deuxième campagne d'immunisation	135
3.1.	La production et la sélection des hybridomes	135
3.2.	Les analyses combinatoires.....	141
4.	Bilan et discussion	143
II.	LE DEVELOPPEMENT DES TESTS IMMUNO-ENZYMATIQUES (<i>EIA</i>)	145
1.	L'optimisation de l' <i>EIA</i>	145

1.1.	Le choix des traceurs couplés à l'acétylcholinestérase	145
1.2.	La détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE	145
1.3.	La recherche du meilleur anticorps monoclonal de capture	146
1.4.	L'optimisation des conditions d'incubation	148
2.	<i>L'EIA optimisé</i>	150
2.1.	L'influence de la température	150
2.2.	L'évaluation de la spécificité	151
2.3.	L'évaluation de la sensibilité	153
3.	<i>L'EIA avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement</i>	153
4.	<i>L'analyse des antigènes reconnus par les anticorps par la technique de western blot</i>	155
5.	<i>Bilan et discussion</i>	156
III.	LES TESTS IMMUNO-CHROMATOGRAPHIQUES (TESTS BANDELETTES)	157
1.	<i>L'analyse combinatoire des bandelettes</i>	157
1.1.	La détermination des combinaisons d'anticorps monoclonaux et leur spécificité	157
1.2.	La détermination de la sensibilité	161
2.	<i>L'analyse sur un grand nombre de souches</i>	163
3.	<i>Les tests des bandelettes avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement</i>	167
IV.	DISCUSSION ET PERSPECTIVES	168
	CONCLUSION GÉNÉRALE	173
	RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	175
	ANNEXES	189
	<i>Annexe 1 : Carte de restriction du vecteur pET-22b(+) (Novagen)</i>	189
	<i>Annexe 2 : Article « Fast and sensitive detection of enteropathogenic Yersinia by immunoassays ».</i> <i>Journal of Clinical Microbiology</i>	190

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Colonies de <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 sur un milieu CIN solide après 24 h d'incubation à 28°C	25
Figure 2 : Propagation de la peste de Justinien en Europe	31
Figure 3 : Propagation de la peste noire au cours du XIV ^{ème} siècle en Europe	32
Figure 4 : Propagation de la troisième pandémie	33
Figure 5 : Le tractus digestif de la puce. D'après (125).....	35
Figure 6 : Puce bloquée et non bloquée par <i>Y. pestis</i> après un repas sanguin sain.....	35
Figure 7 : Cycle infectieux de <i>Y. pestis</i> et voies de transmission à l'homme	37
Figure 8 : Pays ayant reporté des cas de peste humaine entre 1987 et 2009	41
Figure 9 : Le plasmide pYV de <i>Y. enterocolitica</i> W22703	53
Figure 10 : Modèle proposé pour la sécrétion des Yops par translocation de l'injectisome à la cellule cible.....	53
Figure 11 : Modèle proposé pour la sécrétion des Yops par translocation de type toxines AB avec la présence d'une protéine de translocation et une protéine effectrice	54
Figure 12 : Représentation schématique de l'injectisome du système de sécrétion de type III.....	55
Figure 13 : Test immunométrique sur plaque CAS.....	84
Figure 14 : Test immunométrique sur plaque CAS.....	85
Figure 15 : ELISA direct	85
Figure 16 : Test immunométrique à deux sites	86
Figure 17 : Description des bandelettes	87
Figure 18 : Principe du test immuno-chromatographique.....	89
Figure 19 : Titres en anticorps polyclonaux présent dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion .	95
Figure 20 : Titres en anticorps polyclonaux présent dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion .	97
Figure 21 : Immunoblots avec des protéines recombinantes	98
Figure 22 : Caractérisation par « épitope mapping » des épitopes reconnus par l'anticorps YscF12 sur la membrane YscF	99
Figure 23 : Régions épitopiques de la séquence en acides aminés reconnues par « épitope mapping »	99
Figure 24 : Caractérisation par « épitope mapping » des épitopes reconnus par les saignées S3 des souris immunisées et sélectionnées pour les fusions	100
Figure 25 : Régions épitopiques de la séquence en acides aminés reconnues par « épitope mapping » des saignées des souris immunisées	101
Figure 26 : Test ELISA des AcMs anti-LcrV, anti-YscF et anti-YscC avec <i>Y. pestis</i> NC00570 ou <i>E. coli</i> BL21 adsorbées sur la phase solide.....	102
Figure 27 : Tests de réactions croisées sur plaque CAS avec différentes préparations de protéines recombinantes avec les AcMs anti-LcrV, anti-YscF et anti-YscC.	103
Figure 28 : Structure de YscC	106
Figure 29 : Détermination de la concentration optimale de cellules J774A.1 par puits	111
Figure 30 : Activité LDH indiquant la cytotoxicité, dans le surnageant de culture de cellules J774A.1 seules, de <i>Y. pestis</i> NC00570 seules ou lors d'infections réalisées en triplicats en présence ou non des anticorps monoclonaux anti-YscF et anti-LcrV utilisés seuls	112
Figure 31 : Courbe de survie des souris après infection avec <i>Y. pestis</i> CO92 et non traitées (-) ou traitées (-) avec les anticorps monoclonaux LcrV21+LcrV24	113
Figure 32 : Courbe de survie des souris après infection avec <i>Y. pestis</i> CO92 et non traitées (-) ou traitées (-) avec l'anticorps monoclonal YscF17.....	114
Figure 33 : Détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AcHe.....	117
Figure 34 : Détermination de l'anticorps de capture.....	117
Figure 35 : EIA pour la détection de la protéine recombinante LcrV dans différentes matrices	119
Figure 36 : EIA pour la détection de la protéine recombinante YscF dans différentes matrices	119
Figure 37 : Test immuno-chromatographique avec les anticorps anti-LcrV avec la protéine recombinante LcrV	122
Figure 38 : Test immuno-chromatographique avec les anticorps anti-YscF avec la protéine recombinante YscF	123
Figure 39 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion	128
Figure 40 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion	129
Figure 41 : Sélections des hybridomes issus de la fusion Ye sur des plaques de microtitration contenant des bactéries adsorbées	130
Figure 42 : Sélections des hybridomes issus de la fusion Yps sur des plaques de microtitration contenant des bactéries adsorbées	131
Figure 43 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°1 immunisée avec <i>Y. enterocolitica</i> 4/O :3 et sélectionnée pour effectuer la fusion	136
Figure 44 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°4 immunisée avec <i>Y. enterocolitica</i> 4/O :3 et sélectionnée pour effectuer la fusion.	137
Figure 45 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°1 immunisée avec <i>Y. pseudotuberculosis</i> I et sélectionnée pour effectuer la fusion	138

Figure 46 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°4 immunisée avec <i>Y. pseudotuberculosis</i> I et sélectionnée pour effectuer la fusion.	139
Figure 47 : Détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE pour chaque série....	146
Figure 48 : Détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série.	147
Figure 49 : Détermination des conditions optimales des EIAs.....	149
Figure 50 : Impact de la température de croissance des bactéries sur la sensibilité des EIAs optimisés.	151
Figure 51 : Spécificité de l'EIA optimisé pour les <i>Yersinia</i> d'intérêt comparées à d'autres entérobactéries (<i>E. coli</i> , <i>S. sonnei</i> et <i>S. enterica</i>).	152
Figure 52 : Spécificité de l'EIA optimisé	152
Figure 53 : Spécificité de l'EIA avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement.....	154
Figure 54 : Reconnaissance des épitopes protéiques et lipopolysaccharidiques par les anticorps anti- <i>Yersinia</i> utilisés pour l'EIA	156
Figure 55 : Spécificités des tests immuno-chromatographiques	159
Figure 56 : Spécificité du test bandelette 2/O:9 vis-à-vis de différentes souches de <i>Brucella</i>	161
Figure 57 : Sensibilités des tests immuno-chromatographiques	162
Figure 58 : Test immuno-chromatographique multiplex	167
Figure 59 : Exemple de test immuno-chromatographique (bandelettes Ypseudo) utilisant la matrice fèces	168

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Coût moyen sur l'économie américaine des principaux agents pathogènes recensés et responsables de toxi-infections alimentaires en 2010.....	29
Tableau 2 : Peste humaine, nombre de cas et de décès notifiés dans le monde de 1987 à 2009.....	42
Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (265-267)	62
Tableau 4 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (268, 269)	63
Tableau 5 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (270)	63
Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées	74
Tableau 7 : dénomination et caractéristiques des anticorps monoclonaux.....	74
Tableau 8 : Amorces utilisées	77
Tableau 9 : Homologie des séquences des protéines LcrV, YscF et YscC de <i>Y. enterocolitica</i> , <i>Y. pseudotuberculosis</i> et <i>Y. pestis</i>	93
Tableau 10 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux anti-LcrV ; anti-YscF et anti-YscC produits	97
Tableau 11 : Intensité des signaux colorimétriques obtenus (DO _{414 nm}) lors des tests ELISA des AcMs anti-YscC (1 et 0,1 µg/mL) avec <i>Y. pestis</i> NC00570 ou <i>E. coli</i> BL21 adsorbées sur la phase solide.....	102
Tableau 12 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-LcrV.....	108
Tableau 13 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-YscF	109
Tableau 14 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série.	118
Tableau 15 : Limites de détection en ng/mL dans différentes matrices de l'EIA LcrV pour la détection de la protéine recombinante LcrV, et de l'EIA YscF pour la détection de la protéine recombinante YscF	120
Tableau 16 : Résultats de l'analyse combinatoire bandelettes des anticorps anti-LcrV avec <i>Y. pestis</i> NC00570 produisant l'injectisome et le surnageant de culture des mêmes bactéries	121
Tableau 17 : Sensibilités du test immuno-chromatographique (LcrV26/LcrV16*) pour la détection de LcrV dans les matrices biologiques urine ou plasma	123
Tableau 18 : Sensibilités du test immuno-chromatographique (YscF16/YscF17*) pour la détection de YscF dans les matrices biologiques urine ou plasma	124
Tableau 19 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux Ye et Yps produits	132
Tableau 20 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Ye avec <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 à la concentration de 5 x 10 ⁷ cfu/mL	133
Tableau 21 : Résultats de l'analyse combinatoire Yps avec <i>Y. pseudotuberculosis</i> I à la concentration de 5 x 10 ⁷ cfu/mL	134
Tableau 22 : Résultats de l'analyse combinatoire.....	135
Tableau 23 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux Ye3 et Yps1 produits	141
Tableau 24 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Ye3 avec <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 à la concentration de 5 x 10 ⁷ cfu/mL	142
Tableau 25 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Yps1 sur <i>Y. pseudotuberculosis</i> III à la concentration de 5 x 10 ⁷ cfu/mL	142
Tableau 26 : Résultats de l'analyse combinatoire.....	143
Tableau 27 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série.	148
Tableau 28 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination des conditions optimales de l'EIA Ye 2/O:9, l'EIA Ye 4/O:3, l'EIA Y.ps I et l'EIA Y.ps III	149
Tableau 29 : Limites de détection en cfu/mL de l'EIA pour les <i>Yersinia</i> cultivées à 28°C et 37 °C et diluées en tampon EIA.....	153
Tableau 30 : Limites de détection en cfu/mL de l'EIA pour <i>Yersinia</i> cultivée à 28°C et 37 °C dans les fèces artificiellement contaminées	155
Tableau 31 : Résultats de l'analyse combinatoire en bandelettes des anticorps Ye avec <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 produisant l'injectisome et le surnageant de culture des bactéries.....	159
Tableau 32 : Résultats de l'analyse combinatoire en bandelettes des anticorps Yps et Yp avec <i>Y. pseudotuberculosis</i> I	160
Tableau 33 : Spécificités des tests immuno-chromatographiques pour la détection de <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 (bandelette 2/O:9) et <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3 (bandelette 4/O:3).....	164
Tableau 34 : Spécificité du test immuno-chromatographique pour la détection de <i>Y. pseudotuberculosis</i> I, II, III, IV et V (bandelette Ypseudo)	166

ABRÉVIATIONS

AChE	Acétylcholinestérase
AcM	Anticorps monoclonal
ADN	Acide désoxyribonucléique
BET	Bromure d'éthidium
BHI	Milieu Brain Heart Infusion
BSA	Albumine de sérum bovin
CAS	Anticorps de chèvre anti-anticorps de souris
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CFU	Unités formant colonies
CNR	Centre National de Référence
CRISPR	Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
ECL	Electrochemiluminescence
EDTA	Ethylène Diamine Tétra Acétique
EU	Unité Ellman
DMF	Diméthylformamide
DTNB	Acide dithio-bis-nitrobenzoïque
EIA	Enzyme immunoassay
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
HPLC	Chromatographie en phase liquide à haute performance
IgG	Immunoglobuline de type G
IgM	Immunoglobuline de type M
i.n.	Voie intra-nasale
i.p.	Voie intra-péritonéale
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
LB	Milieu Luria-Bertani
LoD	Limite de détection
MLSA	MultiLocus Sequence Analysis
MLST	MultiLocus Sequence Typing
MLVA	MultiLocus Variable-Number Tandem Repeat Analysis
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
PCR	Polymerase chain reaction
PFGE	Électrophorèse en champs pulsé
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
SMCC	<i>N</i> -succinimidyl-4-(<i>N</i> -maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate
s.c.	Voie sous-cutanée
SOC	Super Optimal Broth with Catabolite repression
SSI	Milieu Statens Serum Institut
TSA	Milieu Trypcase Soy Agar

INTRODUCTION GÉNÉRALE

I. LE GENRE *YERSINIA*

Le genre *Yersinia* fut créé en 1974 après le démembrement du genre *Pasteurella* (1). Le nom *Yersinia* fut proposé dès 1944 en l'honneur d'Alexandre Yersin qui isola et identifia la bactérie responsable de la peste en 1894 (2). Le genre *Yersinia* appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et regroupe aujourd'hui 18 espèces : *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis*, *Y. enterocolitica*, *Y. intermedia*, *Y. kristensenii*, *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. aldovae*, *Y. rohdei*, *Y. ruckeri*, *Y. aleksiciae*, *Y. massiliensis*, *Y. similis*, *Y. entomophaga*, *Y. pekkannenii*, *Y. nurmii* et *Y. wautersii* (3-10). Seules, les trois premières espèces citées sont pathogènes pour l'homme. Cependant, elles diffèrent par leurs degrés de pathogénicité, leurs modes d'infection et la maladie qu'elles génèrent. Alors que *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* sont des bactéries entéropathogènes transmises par voie fécale-orale et sont responsables d'infections entériques généralement peu graves, *Y. pestis* est l'agent de la peste, hautement pathogène et au tableau clinique très différent. *Y. wautersii* est la dernière espèce décrite et serait potentiellement pathogène pour l'homme (9). *Y. ruckeri* est un pathogène important des poissons, en particulier des salmonidés, responsable de la maladie entérique de la bouche rouge (11).

Les *Yersinia* possèdent les caractéristiques bactériologiques suivantes : bactérie en forme de bacille, à Gram négatif, aéro-anaérobie facultative, non sporulante et non capsulée. Les *Yersinia* sont mobiles à 25°C et non mobiles à 37°C, à l'exception de *Y. pestis* qui est non mobile à toute les températures (12). Elles sont capables de se multiplier à basses et hautes températures (4 à 42°C), à des pH compris entre 5 et 9,6. Cependant, leur température optimale de croissance, située entre 25 et 28°C, est inférieure à celle des autres entérobactéries. Le temps de génération, autour de deux heures, est plus lent que les bactéries de la même famille. Les *Yersinia* sont des pathogènes intracellulaires facultatifs qui possèdent un tropisme pour les tissus lymphatiques.

1. *Yersinia enterocolitica* et *Yersinia pseudotuberculosis*

1.1 L'historique

Y. pseudotuberculosis fut décrite pour la première fois en 1883 par Louis-Charles Malassez et William Vignal (13, 14). Au cours du temps, cette bactérie reçut de nombreux noms : bacille de la tuberculose zoogléique (1883), *Bacillus pseudotuberculosis* (1889), *Bacterium pseudotuberculosis*

rodentium (1894), *Pasteurella pseudotuberculosis* (1936) jusqu'en 1974 où elle obtient son nom actuel (1, 15). Pendant près d'un demi-siècle, la bactérie n'est quasiment isolée que chez l'animal. Il faut attendre la fin des années 50 pour qu'on reconnaisse la grande fréquence de la maladie chez l'homme (16).

Y. enterocolitica fut décrite pour la première fois en 1934 aux États-Unis par McIver and Pike comme une probable nouvelle espèce sous le nom de *Flavobacterium pseudomallei* Whitmore (17). En 1939 et à partir de cette isolat, Schleifstein et Coleman décrivirent cette bactérie comme proche de *Pasteurella pseudotuberculosis* (l'ancien nom de *Y. pseudotuberculosis*) et ils la nommèrent dès 1943 *Bacterium enterocoliticum* (18, 19). Elle fut également isolée en Europe une dizaine d'années après. De nombreux noms lui furent attribués : *Pasteurella pseudotuberculosis* type b, *Pasteurella* X, *Pasteurella* Y, Germe X et enfin *Yersinia enterocolitica* en 1964 (20). Il est apparu plus tard que de nombreuses espèces apparentées à *Y. enterocolitica* étaient des espèces de *Yersinia* environnementales différentes et non pathogènes. On retrouva la bactérie chez de nombreuses espèces animales mais très peu de cas humains furent reportés jusqu'à la fin des années 60, date à partir de laquelle ce nombre augmenta de façon spectaculaire. En 1976, survient une première anadémie dans cinq écoles de l'État de New York (21). Après avoir consommé du lait chocolaté, 222 enfants et employés tombèrent malades. Cette anadémie conduisit à une véritable prise de conscience de l'importance de cette bactérie en pathologie humaine.

1.2 Le cycle infectieux et les réservoirs

L'espèce *Y. enterocolitica* est un groupe hétérogène de souches caractérisées par six biotypes et soixante sérotypes (22). Les biotypes peuvent être différenciés selon leur degré de pathogénicité : le biotype 1A est considéré comme non pathogène, les biotypes 2, 3, 4 et 5 comme faiblement pathogènes et le biotype 1B comme très pathogène. Il existe de nombreux sérotypes mais seulement onze ont été associés à des cas humains et la majorité le sont seulement avec quatre sérotypes : O:3, O:5,27, O:8 et O:9 (21). Il existe une corrélation entre le biotype et la répartition géographique des souches isolées chez l'homme. Ainsi le sérotype O:3 est réparti dans le monde entier. Les sérotypes O:9 et O:5,27 sont plus particulièrement isolés en Europe et le sérotype O:8 aux États-Unis.

Il existe 21 sérotypes différents de *Y. pseudotuberculosis* (O:1a, 1b, 1c, 2a, 2b, 2c, 3, 4a, 4b, 5a, 5b, 6, 7, 8, 9,10, 11, 12, 13, 14 et 15) regroupés en 15 groupes (de I à XV) (23). C'est le sérotype I qui est le plus souvent isolé et associé aux infections humaines. Une corrélation est également retrouvée entre le sérotype et la répartition géographique des souches isolées chez l'homme. Ce sont les sérotypes I, II, III, V et IV qui sont isolés chez l'homme en Europe, Australie et États-Unis, avec une nette prédominance pour le sérotype I. En Extrême-Orient, ce sont les sérotypes I à V et XV qui sont retrouvés avec une prédominance des sérotypes IV et V.

Le réservoir de ces bactéries est constitué par certains animaux et l'environnement (sol, eau de surface, végétaux souillés par des déjections d'animaux porteurs). La transmission se produit par voie oro-fécale. Après ingestion d'aliments souillés par les *Yersinia* entéropathogènes, les animaux contaminés deviennent le plus souvent porteurs chroniques, mais ils peuvent également développer une maladie systémique à la suite d'un stress comme la famine ou le froid. L'homme s'infecte par voie orale, soit en consommant des aliments souillés (laits et dérivés, œufs, viandes, végétaux crus ou mal cuits...) ou de l'eau contaminée, soit par contact avec des animaux domestiques ou sauvages porteurs du bacille, soit par transmission interhumaine manuportée depuis un individu malade ou porteur asymptomatique. Après transit dans le tractus digestif où les bactéries exercent leur pouvoir pathogène, elles se retrouvent dans les fèces et peuvent servir de source de contamination pour un nouvel hôte ou l'environnement. Une transmission nosocomiale ou par des produits sanguins infectés existe mais elle est très rare (24).

Y. enterocolitica a été isolée chez une grande variété d'animaux symptomatiques et asymptomatiques. On retrouve des animaux domestiques (chiens, chats), des animaux d'élevage (porcs, vaches, buffles, chevaux, moutons, chèvres, lapins, chinchillas, visons...), des animaux de parcs zoologiques (singes, rongeurs, oiseaux...), des animaux sauvages (cerfs, renards, chats sauvages, castors, ratons, autres petits mammifères, oiseaux, crustacés, grenouilles, escargots...) (23). La distribution de certains biotypes semble étroitement associée à certaines espèces (25).

Les souches du biotype 1A sont très fréquemment retrouvées dans l'environnement. Dans certains pays européens, il est même le biotype retrouvé de façon prédominante dans les échantillons de fèces (26, 27). Mais le biotype 1A est considéré comme non pathogène. Cette considération reste un sujet controversé depuis que plusieurs études ont révélé la présence de facteurs de virulence chez certaines souches du biotype 1A (28, 29). Néanmoins, ce biotype n'a jamais été associé avec des cas cliniques humains.

Les *Y. enterocolitica* pathogènes du biosérotype 4/O:3 sont les plus fréquentes et sont retrouvées dans le monde entier, suivies par les souches du biosérotype 2/O:9 (23). Ces deux souches sont plus souvent associées à des cas sporadiques ou des épidémies limitées à un cercle restreint (30). Elles peuvent parfois être responsables d'épidémies (31, 32). Pour les souches du biosérotype 4/O:3, le porc se trouve être le principal réservoir (33). Il est à noter que le porc ne développe aucun signe clinique. En ce qui concerne les souches du biosérotype 2/O:9, elles sont préférentiellement retrouvées chez les bovins, ovins et caprins. Cependant, on ne sait toujours pas pour ce biosérotype si la contamination intervient lors de la manipulation d'animaux, la consommation de leur viande ou la consommation de légumes contaminés par des déjections animales.

Les *Y. enterocolitica* du biotype 1B sont présentes dans l'environnement, notamment l'eau, et chez le porc. Elles sont principalement retrouvées en Amérique du Nord où elles étaient la souche prédominante jusqu'à la fin des années 80. Elles sont aujourd'hui dépassées par les souches 4/O:3. On les retrouve dans une moindre mesure au Japon et très rarement en Europe. Le biosérotype 1B/O:8

peut être responsable de cas sporadiques, notamment lors d'ingestion d'eau contaminée, mais est plus souvent associé à des anadémies au sein de grandes communautés aux États-Unis (34). C'est d'ailleurs ce biosérotype qui fut responsable de la première anadémie de 1976.

Les *Y. enterocolitica* du biotype 3 sont très rarement isolées et leurs réservoirs ne sont pas clairement établis. Elles peuvent être responsables de cas humains, notamment pour le biosérotype 3/O:5,27. Les *Y. enterocolitica* du biotype 5 ont déjà été isolées chez le lièvre, les ovins et les caprins. Cependant, elles n'ont pas causé d'infections humaines depuis de nombreuses années en France.

Le principal réservoir de *Y. pseudotuberculosis* est constitué par certaines espèces de rongeurs comme les souris et les rats (23). Mais cette bactérie peut être hébergée par un grand nombre d'autres espèces animales : animaux domestiques (chiens, chats), animaux d'élevage (porcs, bovins, ovins...), animaux sauvages (lièvres, chiens viverrins, primates...) ou oiseaux (pigeons, canaries...). Le bacille est d'ailleurs responsable de la mort de nombreux animaux, notamment dans les élevages ou les parcs zoologiques (35). Des infections dues à de l'eau contaminée sont fréquentes dans les zones montagneuses du Japon et de la Corée où le temps est pluvieux et où l'eau utilisée n'est pas traitée. En comparaison avec les pays occidentaux, *Y. pseudotuberculosis* est rarement isolée dans l'environnement et les infections se produisent avec la consommation de végétaux souillés par des animaux. De plus, la contamination de porc suggère que sa viande peut également être une source d'infection pour l'homme. Aujourd'hui, les infections à *Y. pseudotuberculosis* apparaissent majoritairement sous forme de cas sporadiques mais peuvent parfois prendre une forme épidémique comme en Scandinavie, au Japon ou en Russie (36). En France, une apparition soudaine de 27 cas d'infection à *Y. pseudotuberculosis* s'est produite lors de l'hiver 2004-2005 (37).

1.3 L'importance des *Yersinia* entéropathogènes en médecine vétérinaire

1.3.1. Yersinia enterocolitica

Les *Y. enterocolitica* sont retrouvées dans de nombreux élevages destinés à l'alimentation humaine comme les élevages bovins ou de volailles, et plus particulièrement les élevages porcins (38). En effet, le porc se trouve être le principal réservoir des souches du biosérotype 4/O:3 (33). Bien qu'il ne développe pas de signes cliniques, la bactérie est présente au sein du nasopharynx, de l'oropharynx, des nœuds lymphatiques, de l'intestin et des fèces de l'animal (38). Une étude réalisée en 1988 au Danemark a mis en évidence la présence de la bactérie chez 360 porcs abattus parmi 1458 (39). En 2010, dans une autre étude réalisée en France, la bactérie était présente sur les amygdales de 414 porcs vivants sur 3120 (40). De plus, la bactérie est capable de persister au sein d'un élevage, et cela sur plusieurs lots successifs d'animaux.

Il semble que le processus d'abattage soit la cause la contamination de la viande de porc (41). En raison de leur nature psychrotrophe, les souches pathogènes de *Y. enterocolitica* présentes dans la

viande et les sous-produits peuvent se multiplier pendant leur conservation (38). Ainsi, les basses températures trouvées tout le long de la chaîne du froid fournissent des conditions idéales pour la multiplication de *Y. enterocolitica* qui peuvent ainsi survivre dans la viande de porc pendant cinq semaines, que la viande soit ou non conservée sous vide (42). Ainsi, la manipulation et la consommation de cette viande crue ou pas assez cuite sont les principales causes d'infection. Il ne faut oublier que les travailleurs en contact avec ces animaux (éleveurs ou employés d'abattoirs) sont plus fortement exposés à une éventuelle contamination (43).

1.3.2. *Yersinia pseudotuberculosis*

Les conditions d'élevage sont étroitement liées à l'apparition de maladies. Ainsi, des milieux différents du milieu originel de l'animal, une densité de population forte ou une alimentation reconstituée sont favorables au développement de pathologies. Parmi celles-ci, la pseudotuberculose revêt une importance particulière car elle affecte fréquemment de nombreux élevages et parcs, pouvant même aller jusqu'à de véritables épizooties. En plus d'être responsable d'entérites pouvant aboutir à la mort de l'animal, *Y. pseudotuberculosis* est aussi une cause non négligeable d'avortements (44).

Les infections peuvent être traitées par antibiothérapie en plus d'un traitement symptomatique. Cependant, le diagnostic chez l'animal arrivant bien après l'apparition des symptômes, il est souvent trop tard pour espérer une guérison (45). De plus, même si des traitements thérapeutiques et prophylactiques sont entrepris, il semble impossible d'éradiquer *Y. pseudotuberculosis* de par sa présence naturelle dans l'environnement et de par l'existence d'animaux porteurs sains dans les élevages et les parcs mais aussi la présence d'animaux autochtones réservoirs.

Outre des règles sanitaires élémentaires (hygiène, quarantaine, surveillance de l'eau et des aliments, lutte contre les rongeurs...) une vaccination peut être proposée. En Europe, un vaccin appelé « Pseudovac » est réalisé par la faculté vétérinaire d'Utrecht (Pays-Bas). Ce vaccin entier comportant des bactéries inactivées du sérotype I à VI est fréquemment utilisé. Cependant, son efficacité n'a jamais été prouvée et des cas de pseudotuberculose sont observés chez des animaux vaccinés (35). En Nouvelle-Zélande, le vaccin « Yersiniavax » est proposé par MSD Animal Health. C'est également un vaccin entier inactivé destiné aux cervidés. Il semble conférer une protection significative mais limitée dans son champ d'application à une famille d'animaux et une zone géographique (45). Un vaccin oral contenant une souche vivante atténuée réalisé par l'Institut Pasteur confère une bonne protection chez le cobaye et semble être une bonne alternative à ces vaccins (35).

La pseudotuberculose étant une zoonose, le risque d'une contamination des travailleurs dans les élevages ou les parcs et de tout métier relatif à la manipulation des animaux, vivants ou non, n'est pas à négliger.

1.4 L'épidémiologie

Les infections dues aux *Yersinia* sont appelées yersiniozes. Cependant, les infections à *Y. pseudotuberculosis* peuvent être décrites sous le terme de pseudotuberculose. Elles sont réparties dans le monde entier même si leur incidence est supérieure dans les pays froids et tempérés. Elles peuvent toucher toutes les tranches d'âges. Cependant, il apparaît que les deux tiers des infections à *Y. enterocolitica* touchent les nourrissons et les jeunes enfants de moins de 5 ans. Au contraire, les trois quarts des infections à *Y. pseudotuberculosis* surviennent chez les 5-20 ans. Les cas les plus graves sont majoritairement retrouvés chez des sujets affaiblis (personnes âgées, sujets immunodéficients ou souffrant d'une autre pathologie) (46). Même si les infections se produisent toute l'année, un léger pic est observé de juillet à octobre durant les mois chauds pour les infections à *Y. enterocolitica*, alors que les infections à *Y. pseudotuberculosis* ont tendance à prédominer de décembre à mars (47).

Une augmentation spectaculaire de l'incidence de *Y. enterocolitica* fut observée à partir des années 60. Elle s'explique notamment par une meilleure identification de la bactérie et le développement de la chaîne du froid pour améliorer la conservation des aliments. En effet, de par leur nature psychrotrophe, les bactéries du genre *Yersinia* sont capables de se multiplier à basse température. Ainsi, un nombre initialement faible de bactéries dans un aliment contaminé va rapidement augmenter au cours de sa conservation au réfrigérateur (4°C). Cependant, l'incidence des yersiniozes entériques est sans doute encore sous-évaluée en raison de la difficulté toujours présente à réaliser son diagnostic.

Les *Yersinia* entéropathogènes sont considérées avec les *Campylobacter*, *Salmonella* et *Shigella* comme les principales bactéries responsables de diarrhées dans les pays froids et tempérés. En 2011, l'Autorité Européenne de Sécurité des Aliments (EFSA) rapporte que *Y. enterocolitica* est la troisième cause de diarrhées bactériennes en Europe après *Salmonella* et *Campylobacter* (48). En 2010, en Europe, 6 909 cas confirmés furent rapportés puis 7 041 cas l'année suivante, correspondant à une incidence de 2,19 cas pour 100 000 habitants (49). La majorité de ces infections serait liée à une consommation de viande de porc contaminée et insuffisamment cuite.

Les infections à *Y. pseudotuberculosis* sont beaucoup plus rares que les infections à *Y. enterocolitica*. En effet, *Y. enterocolitica* est impliquée dans 98,4% des cas déclarés alors que l'infection à *Y. pseudotuberculosis* représente seulement 0,9% des cas, à l'exception de la Russie où *Y. pseudotuberculosis* semble plus prévalent. Les hommes semblent plus susceptibles au *Yersinia* que les femmes avec un ratio d'infections homme/femme de 1,2:1. En Europe, le nombre de cas confirmés est plus élevé en Allemagne, Estonie, Lituanie, Luxembourg, République tchèque et Slovaquie (49). Il faut cependant noter que dans ces pays, une surveillance est organisée au niveau national et que la découverte de *Yersinia* entéropathogènes est soumise à une déclaration obligatoire aux autorités de

santé. En France, la déclaration est effectuée sur la base du volontariat au « Centre National de Référence de la peste et autres yersinioses » (CNR) se situant à l'Institut Pasteur de Paris. Entre 2006 et 2010, 1 679 souches isolées en France ont été adressées au CNR pour identification (47). Parmi celles-ci, 1 056 étaient pathogènes (63%) et se partageaient entre 994 souches de *Y. enterocolitica* et 62 souches de *Y. pseudotuberculosis*. Les autres souches correspondaient au biotype 1A non pathogène de *Y. enterocolitica* ou à d'autres espèces de *Yersinia*.

Les souches de *Y. enterocolitica* adressées au CNR appartenait à trois biotypes (2, 3 et 4) et parmi celles-ci, la majorité était du biosérotype 4/O:3 (781 souches) suivie du biosérotype 2/O:9 (175 souches). Les souches de *Y. pseudotuberculosis* étaient majoritairement du sérotype I (84%) puis des sérotypes II et III.

Cependant, il est difficile d'estimer la véritable incidence des infections à *Yersinia* entéropathogènes pour plusieurs raisons. Tout d'abord, Les *Yersinia* poussent difficilement et lentement sur les milieux usuels et sont facilement masquées par d'autres bactéries présentes dans les échantillons de fèces. Un milieu sélectif de référence des *Yersinia* appelé Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine (CIN) existe mais il est onéreux, demande une charge de travail supplémentaire et par conséquent n'est pas utilisé par tous les laboratoires. De plus, ce milieu sélectif peut aussi inhiber partiellement ou totalement la croissance de certaines *Yersinia* et en particulier *Y. pseudotuberculosis* (50), ce qui peut expliquer en partie sa faible incidence reportée. Enfin en France, l'envoi des souches au CNR n'est pas obligatoire. Le nombre de souches isolées ne reflète donc pas la morbidité réelle de ces infections.

Depuis une dizaine d'années, les infections humaines causées par les *Yersinia* entéropathogènes rapportées au CNR apparaissent en diminution en France. Cette diminution peut avoir plusieurs origines : une meilleure maîtrise du danger dans la chaîne alimentaire, une baisse des prescriptions de coprocultures, ou une diminution de la capacité à rechercher correctement les *Yersinia* entéropathogènes. En 2003 une enquête fut réalisée en France auprès de laboratoires d'analyses médicales afin de déterminer le nombre de coprocultures avec recherche de *Yersinia* effectuées, d'estimer la fréquence d'isolement des *Yersinia* dans ces coprocultures, de faire un inventaire des différentes méthodes d'isolement utilisées et de déterminer le taux d'identification et de caractérisation des souches (51). Il est ainsi apparu que l'évaluation du risque des *Yersinia* entéropathogènes n'était pas satisfaisant en France pour plusieurs raisons, et en particulier parce que leur recherche dans les coprocultures n'est pas effectuée systématiquement. Ainsi, le nombre de souches reçues au CNR sous-estime fortement le nombre réel d'infections humaines aux *Yersinia* entéropathogènes.

1.5 La physiopathologie

La dose minimale infectante n'est pas précisément connue. Cependant, selon l'Agence nationale de sécurité sanitaire de l'alimentation, de l'environnement et du travail (ANSES) elle serait de 10^6 bactéries alors que selon l'Agence de santé publique du Canada, elle serait au minimum de 10^8 bactéries. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont normalement ingérées à partir d'aliments ou de boissons contaminés puis atteignent l'estomac. Des études suggèrent qu'en présence d'urée, les *Yersinia* entéropathogènes sont capables de survivre plus de 90 minutes à un pH inférieur à 2 (23). La concentration normale d'urée retrouvée dans l'estomac humain serait suffisante pour permettre la survie de *Y. enterocolitica* mais pas de *Y. pseudotuberculosis*. Il apparaît que les deux bactéries possèdent une uréase mais celle-ci ne serait nécessaire qu'à la survie de *Y. enterocolitica* (52, 53). Ceci expliquerait le retard dans la colonisation de l'iléon observé avec *Y. pseudotuberculosis*. Par la suite, les bactéries prolifèrent préférentiellement au niveau de l'iléon et du cæcum. C'est en effet à ce niveau que sont localisées les plaques de Peyer qui sont la porte d'entrée des *Yersinia* entéropathogènes dans l'organisme. Le passage de l'épithélium intestinal commence par l'invasion des cellules M, puis par translocation, les bactéries rejoignent les plaques de Peyer sous-jacentes (54). A ce niveau, les bactéries semblent inhiber la phagocytose et sont résistantes à l'action bactéricide du sérum.

Par la suite, *Y. enterocolitica* est classiquement responsable d'entérocrites aiguës et d'iléites terminales alors que *Y. pseudotuberculosis* dissémine vers les ganglions mésentériques où elle s'y multiplie, causant une adénite mésentérique (55).

Lors d'entérocrites à *Y. enterocolitica*, l'histopathologie suggère une infection aiguë. Une réaction inflammatoire diffuse avec afflux de neutrophiles sans bactéries visibles est observée au niveau de la lamina propria. Des altérations de la muqueuse intestinale peuvent être présentes. Lors d'infections de l'iléon, des micro-abcès sont localisés au niveau des plaques de Peyer. Ce processus nécrotique peut aller jusqu'à la présence d'ulcérations en dehors de ces plaques.

Lors d'infections à *Y. pseudotuberculosis*, l'histopathologie suggère une infection moins aiguë. Une réaction inflammatoire est retrouvée au niveau du paracortex des ganglions mésentériques avec afflux de macrophages. Des granulomes tuberculoïdes peuvent être observés ainsi que l'apparition de micro-abcès secondaires.

Les formes systémiques sont dues à la translocation des bactéries présentes dans la lumière intestinale vers les organes profonds (foie, rate), sans transiter par les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques (56). La voie empruntée par ces bactéries pour atteindre ces organes est encore inconnue. Cependant, il semblerait que *Y. pseudotuberculosis* dissémine de façon intracellulaire. De plus *in vitro*, *Y. pseudotuberculosis* semble capable de survivre et de répliquer à l'intérieur des macrophages, et les neutrophiles humains sont capables de transloquer *Y. enterocolitica* à travers l'endothélium (57, 58).

1.6 Les manifestations cliniques

La période d'incubation des infections à *Yersinia* entéropathogène varie de 1 à 11 jours et la durée des symptômes varie de 3 à 28 jours.

Les infections à *Y. enterocolitica* peuvent provoquer deux formes cliniques différentes. La forme digestive, décrite comme une entérite aiguë, touche surtout les jeunes enfants. Elle est accompagnée des différents symptômes suivants : diarrhées (80,6% des cas), douleurs abdominales (77,2%), fièvre (54,8%), ténésme (20,5%), et vomissements (19,4%) (59). Il faut noter que les diarrhées sont le plus souvent retrouvées chez les enfants âgés de moins de cinq ans (95% des cas) et peuvent persister durant quatorze jours alors que les douleurs abdominales sont plus prépondérantes après cet âge (85,2%) (60). D'autres symptômes, tels que maux de tête, fatigue, présence de sang dans les selles ou nausées, peuvent se produire moins fréquemment. L'infection est le plus souvent modérée et résolutive spontanément. La forme extra-digestive correspond à des formes graves avec localisations profondes et/ou dissémination systémique (septicémie). Elle engage souvent le pronostic vital. La présence *Y. enterocolitica* a déjà été associée avec des anévrismes mycotiques et des endocardites (61, 62). Dans les cas d'infections de longue durée, une altération importante de l'état général est parfois observée. Ces infections sévères et invasives à l'issue parfois fatale sont retrouvées plus fréquemment chez les personnes âgées et chez certains sujets malades présentant une surcharge en fer (thalassémie, hémochromatose...), présentant une immunodéficience, sous traitement d'hémodialyse, souffrant de maladies hépatiques ou souffrant de diabète (23).

Les infections à *Y. pseudotuberculosis* peuvent aussi survenir sous ces deux formes cliniques. La forme digestive est décrite comme une adénite mésentérique et touche majoritairement des sujets jeunes et en bonne santé. Dans les cas les moins graves, la pathologie se traduit par de la fièvre, parfois une diarrhée et surtout par des douleurs abdominales. La forme extra-digestive est aussi principalement retrouvée chez les personnes âgées et les sujets présentant un terrain fragilisant. Elle se traduit par des abcès profonds touchant le foie et la rate, ou une dissémination systémique fréquemment mortelle. Bien que rarement décrit, *Y. pseudotuberculosis* serait capable de causer des anévrismes mycotiques (63). De nos jours, la pseudotuberculose semble peu fréquente en France mais se traduit le plus souvent par des formes sévères et généralisées.

Dans les deux cas, les douleurs abdominales peuvent être localisées au niveau de la fosse iliaque droite (42% des cas) et peuvent évoquer une appendicite (syndrome pseudo-appendiculaire) (59, 64). Ce symptôme est retrouvé majoritairement chez des enfants âgés et de jeunes adultes. Lors d'un recours à la chirurgie, l'appendice retiré est généralement sain, mais les ganglions mésentériques sont hypertrophiés et une inflammation de la partie terminale de l'iléon est retrouvée.

Les *Yersinia* entéropathogènes peuvent fréquemment causer de graves complications secondaires telles que la polyarthrite réactionnelle et l'érythème noueux (65, 66). La polyarthrite réactionnelle est une complication auto-immune secondaire qui touche les grosses articulations. Elle

peut survenir 1 à 2 semaines à la suite de la forme digestive et peut durer de 1 à 4 mois. Des études ont montré que 80 % des patients présentant une polyarthrite réactionnelle à *Y. enterocolitica* étaient porteurs de l'antigène du complexe majeur d'histocompatibilité HLA-B27 (67). L'érythème noueux est une hypodermite qui survient 2 à 30 jours après le début des signes cliniques. Il prédomine au niveau des membres inférieurs et s'accompagne parfois d'une fièvre. D'autres manifestations comme le syndrome de Fiessenger-Leroy-Reiter, la glomérulonéphrite ou la myocardite peuvent être considérées comme des complications secondaires à une infection aux *Yersinia* entéropathogènes.

Y. enterocolitica est une des bactéries les plus fréquemment responsables du choc septique post-transfusionnel. Cette forme rare mais gravissime d'infection peut arriver à cause de la capacité des *Yersinia* à se multiplier à basse température. En effet, des bactéries circulant de façon transitoire dans le sang d'un donneur asymptomatique peuvent être prélevées et se multiplier dans les concentrés globulaires au cours de leur stockage au froid (23). Lors de la transfusion, une dose massive de bactéries est alors injectée directement par voie intraveineuse chez le receveur. Le choc septique qui en résulte est très fréquemment mortel (dans 54,5% des cas) (24). Il est parfois associé à des diarrhées explosives. L'incidence en France de ce type d'accident post-transfusionnel a été estimée à environ un cas pour 6,5 millions de concentrés globulaires distribués.

En Corée, au Japon et dans la partie extrême-orientale de la Russie, les infections à *Y. pseudotuberculosis* revêtent une forme différente (68). Les symptômes ne sont pas seulement gastro-intestinaux, mais associent un syndrome fébrile à des manifestations scarlatiniformes (éruptions cutanées, desquamation), pouvant aller jusqu'à des atteintes articulaires, hépatiques, rénales ou nerveuses. Cette forme est appelée fièvre scarlatiniforme d'Extrême-Orient. Il semblerait que la différence dans les manifestations cliniques entre les pays de l'Ouest et de l'Est soit due à l'hétérogénéité de la distribution de deux facteurs de virulence chez *Y. pseudotuberculosis* : le Super-antigène *Y. pseudotuberculosis* (YPMa) et l'Îlot de Haute Pathogénicité (HPI). Plus particulièrement au Japon, il a été suggéré que *Y. pseudotuberculosis* pourrait jouer un rôle dans la maladie de Kawasaki dont l'agent étiologique n'a toujours pas été découvert (69).

1.7 Le diagnostic

Le diagnostic clinique d'une infection à *Yersinia* entéropathogènes repose généralement sur un diagnostic bactériologique avec l'isolement et l'identification de la bactérie responsable. Il n'existe pas de procédure unique permettant de détecter toutes les souches pathogènes. C'est une caractérisation plus poussée par biotypage ou sérotypage qui permet ensuite de déterminer s'il s'agit ou non de souches pathogènes. D'autres tests, comme le diagnostic moléculaire par la recherche de gènes cibles ou le diagnostic sérologique peuvent être utiles quand la bactérie n'a pu être isolée.

1.7.1 Le diagnostic bactériologique classique

Les *Yersinia* entéropathogènes sont principalement recherchées dans les fèces par coproculture ou plus rarement à partir du sang par hémoculture ou à partir de localisations plus profondes. Cependant, les *Yersinia* ont une croissance plus lente que les autres entérobactéries et une température optimale de croissance de 28°C au lieu de 37°C, ce qui rend leur isolement plus difficile à partir d'échantillons biologiques contenant de nombreuses autres bactéries. Pour améliorer cela, une étape d'enrichissement peut être effectuée. La croissance possible des *Yersinia* à 4°C permet l'utilisation d'enrichissement au froid pour augmenter la proportion de *Yersinia* dans l'échantillon. Cependant, cette technique favorise la croissance de *Yersinia* non pathogènes et sa durée de une à trois semaines limite son intérêt pour le diagnostic clinique. L'utilisation de bouillons d'enrichissement pendant quelques jours est également possible. De nombreux milieux de culture sélectifs ont été développés pour permettre l'isolement de *Y. enterocolitica* (SSDC modifié, BABY4, VYE, KV202, YeCM...), mais la croissance de *Y. pseudotuberculosis* sur ces milieux est inhibée ou non testée (50). De plus, leur non commercialisation n'autorise pas une utilisation en routine au sein des laboratoires d'analyses médicales. Cependant, un milieu semi-sélectif est commercialisé et considéré à ce jour comme le milieu de référence pour l'isolement des *Yersinia* entéropathogènes. Il s'agit du milieu Cefsulodine-Irgasan-Novobiocine (CIN) qui propose une bonne spécificité et sensibilité pour la détection de *Y. enterocolitica*. Après incubation à 28°C, la présence de colonies caractéristiques est vérifiée à 24 h et 48 h (figure 1). C'est le milieu le plus utilisé dans les laboratoires d'analyse médicale. Cependant, il empêche la croissance de certaines souches de *Y. pseudotuberculosis* mais pas celle de certaines espèces bactériennes de la flore intestinale telles que les *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pseudomonas* et *Serratia* (50, 70). Un autre milieu récemment commercialisé et appelé Statens Serum Institut Enteric Medium (SSI) permet l'isolement de *Y. enterocolitica* mais toujours pas de *Y. pseudotuberculosis* et cela de façon moins sensible que le CIN (50).

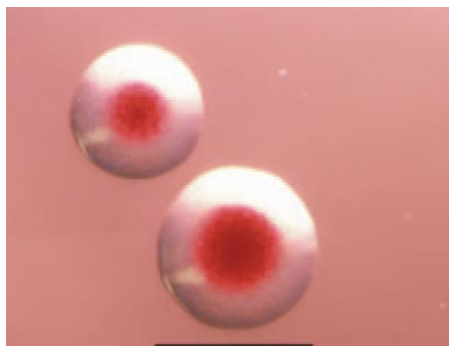


Figure 1 : Colonies de *Y. enterocolitica* 4/O:3 sur un milieu CIN solide après 24 h d'incubation à 28°C. Aspect « œil de bœuf » typique des colonies incolores et rouges au centre. Barre noire = 1 mm. D'après (71).

L'isolement réalisé permet d'effectuer l'étude des caractères phénotypiques et biochimiques afin de déterminer l'espèce. Les tests biochimiques peuvent être effectués de façon traditionnelle mais aussi avec des tests commerciaux tels que les galeries de type API 20E ou 50CH (Biomérieux). Cependant, pour obtenir une identification fiable, ils doivent être effectués à 28°C au lieu de 37°C.

Après identification de l'espèce, il est nécessaire de déterminer la pathogénicité, et pour *Y. enterocolitica*, le biotypage reste le meilleur moyen pour différencier plus particulièrement les souches pathogènes des souches non pathogènes du biotype 1A. Le biotypage repose sur des tests biochimiques supplémentaires selon un schéma proposé par Georges Wauters (72). Il est important de pouvoir caractériser les souches car la pathogénicité est différente selon le biotype. Ainsi les souches du biotype 4 sont les plus fréquemment isolées chez les malades mais l'infection se limite le plus souvent au tractus digestif (73). Les souches du biotype 2 causent souvent des septicémies lorsqu'il existe un terrain fragilisé chez le malade. Enfin, les souches du biotype 1B sont très pathogènes et ont une forte propension à provoquer une infection systémique, même chez des sujets non fragilisés. Pour *Y. pseudotuberculosis*, toutes les souches sont considérées comme pathogènes et la détermination du biotype n'est pas réalisée.

Par la suite, le sérotypage peut être effectué pour toutes les espèces de *Yersinia* entéropathogènes par séro-agglutination. Cependant, il ne peut être réalisé que par certains laboratoires spécialisés. Il est basé sur la variabilité de l'antigène O du lipopolysaccharide (LPS) à la surface des bactéries et ne peut être effectué que par quelques laboratoires spécialisés qui possèdent des antisérums spécifiques des *Yersinia*. Il existe 60 sérotypes pour *Y. enterocolitica* dont 11 sont associés à des souches pathogènes, et 21 sérotypes pour *Y. pseudotuberculosis*. Il existe une corrélation entre biotype pathogène et sérotype chez *Y. enterocolitica* (73). Ainsi, le biotype 4 est toujours associé au sérotype O:3, le biotype 2 aux sérotypes O:9 et O:5,27 et le biotype 3 aux sérotypes O:5,27 et O:3. Cependant, plusieurs antigènes O, comme O:3, O:8 ou O:9, sont aussi trouvés chez des souches non pathogènes (21).

Même s'il n'est pas systématique, un lysotypage peut également être effectué pour caractériser les *Y. enterocolitica*. Cependant en France, il n'est réalisé que par le CNR (73).

Enfin, si la souche isolée ne correspond pas aux critères classiques d'identification, des analyses moléculaires peuvent être effectuées au moyen de recherche de gènes de virulence par PCR, par séquençage de l'ARN 16S ou par Multilocus Sequence Analysis (MLSA).

1.7.2 Les autres méthodes de détection

Il apparaît clairement que le diagnostic bactériologique classique des *Yersinia* à partir d'échantillons polymicrobiens n'est pas assez performant. Pour cette raison, différentes méthodes moléculaires ont été développées. Des méthodes d'hybridation utilisant des sondes moléculaires ciblant des séquences d'ADN ont été mises au point (74, 75). Elles ne nécessitent pas d'isolement

préalable des bactéries mais la présence d'une flore bactérienne secondaire diminue l'efficacité de l'hybridation ADN-ADN. D'autres techniques comme le multilocus sequence typing (MLST) ou l'électrophorèse en champ pulsé (PFGE) ont été développées mais sont plus utiles pour réaliser des études épidémiologiques (76, 77). Au final, la PCR reste la seule méthode moléculaire utilisée en laboratoire d'analyses médicales pour caractériser les souches après l'isolement mais pas pour le diagnostic des yersiniozes.

Les différentes techniques de PCR peuvent offrir une bonne spécificité et sensibilité pour détecter les *Yersinia* entéropathogènes au sein d'échantillons polymicrobiens biologiques ou alimentaires (78, 79). Cette sensibilité peut même s'approcher de la détection d'une seule bactérie dans une matrice simple (tampon d'analyse) en utilisant des techniques de PCR en temps réel mais redescend vers 10^4 cfu/g dans une matrice complexe (viande) (80). Plus récemment, la technique PCR a été utilisée pour réaliser le sérotypage des souches virulentes de *Y. enterocolitica* (81). Cependant, cette technique ne permet pas de différencier les bactéries mortes des vivantes. De plus, les revers de cette forte sensibilité sont l'apparition de résultats faussement positifs à cause de contaminations croisées pouvant se produire au sein des laboratoires et l'existence d'une grande variabilité des résultats selon l'expérimentateur. Cette technique nécessite également un équipement particulier. De plus, les matrices (alimentaires ou biologiques) peuvent contenir de nombreuses substances inhibitrices de la PCR. Ainsi l'analyse de ces échantillons nécessite la réalisation d'étapes de traitements, notamment par enrichissement, purification de l'ADN ou séparation immunomagnétique (82). Les techniques de PCR ne peuvent donc pas à l'heure actuelle se substituer à l'isolement et la caractérisation de la souche.

Le diagnostic sérologique peut s'avérer utile si la bactérie n'a pas été isolée. La recherche d'anticorps spécifiques des *Yersinia* entéropathogènes peut être réalisée dans le sérum des patients par séro-agglutination, ELISA ou western blot (83, 84). La séroconversion se produit deux à sept jours après le début des symptômes cliniques et peut perdurer jusqu'à douze mois si une complication secondaire de type arthrite se produit (85, 86). Il est important de noter qu'il existe une parenté antigénique entre l'antigène O:9 de *Y. enterocolitica* et celui des *Brucella* et de *E. coli* O157, et une parenté entre les antigènes des sérotypes II et IV de *Y. pseudotuberculosis* et des groupes B et D de *Salmonella* (84). Ceci peut mener à fausser l'interprétation d'une sérologie.

Plus récemment, les techniques de spectrométrie de masse avec notamment les instruments de type MALDI-TOF ont été étudiées (87, 88). S'il semble que le biotypage et le sérotypage soient possibles, les échantillons nécessitent un traitement et un appareillage conséquent et onéreux.

Cependant, l'analyse des souches de *Yersinia* entéropathogènes s'arrête le plus souvent au niveau du genre ou de l'espèce. Ainsi, les analyses permettant de différencier les souches pathogènes des non pathogènes ne sont pratiquement jamais effectuées par les laboratoires d'analyses médicales. Des traitements non justifiés sont donc probablement administrés à des patients chez lesquels une *Yersinia* non pathogène a été isolée des selles.

1.8 Les traitements des yersinioses

1.8.1 L'antibiothérapie

Les infections modérées à *Yersinia* entéropathogènes sont normalement spontanément résolutive en suivant quelques mesures hygiéno-diététiques simples. Leur traitement doit être avant tout symptomatique car pour les formes modérées et seulement digestives, un traitement antibiotique n'est pas nécessaire (89, 90). Il est au contraire recommandé pour les cas sévères ou prolongés avec complications, et plus particulièrement lors de suspicions d'une septicémie ou chez des sujets immunodéficients. Les antibiotiques communément utilisés en première intention sont les fluoroquinolones (ciprofloxacine et ofloxacine). Le chloramphénicol, la gentamicine, la tétracycline et l'association du triméthoprim avec le sulfaméthoxazole peuvent également être utilisés.

A ce jour, les traitements antibiotiques n'ont pas montré d'efficacité dans la diminution de la durée des symptômes et aucun lien n'a été démontré entre leur utilisation et la survenue de complications secondaires (59). Cependant, une forte proportion de traitements antibiotiques non appropriés sont administrés à des patients souffrant de yersinioses en dépit des recommandations indiquant leur usage pour les cas sévères uniquement.

Il est à noter qu'il n'existe pas de vaccin pour l'homme contre les infections aux *Yersinia* entéropathogènes.

1.8.2 L'antibiorésistance

Y. enterocolitica possède naturellement deux gènes chromosomiques codant des bêta-lactamases appelées enzymes A et B (91, 92). Les enzymes A, exprimées constitutivement, hydrolysent les bêta-lactamines et les céphalosporines de première génération. Celles de type B, inducibles, ont une forte activité céphalosporinase. Bien qu'elles soient nommées ainsi, il faut cependant noter que selon la classification de Sykes et Matthew (93), elles sont considérées respectivement comme des bêta-lactamases de classe A et C. Les souches environnementales et non pathogènes du biotype 1A produisent l'enzyme A et une enzyme « B-like » similaire à l'enzyme B.

La susceptibilité des différentes souches de *Y. enterocolitica* à ces antibiotiques dépend exclusivement de la présence d'une ou deux de ces enzymes. Ainsi, les souches du biosérotype 2/O:5,27 ne possèdent pas l'enzyme A et sont donc sensibles à la ticarcilline et à la carbénicilline. Les souches du biosérotype 1B/O:8 possèdent une enzyme A légèrement différente appelée « A-like » qui n'est pas aussi efficace que la forme A pour hydrolyser l'ampicilline et la carbénicilline, rendant les souches sensibles à ces antibiotiques. Certaines souches du biosérotype 4/O:3 appartenant au lysotype IXb et isolées en Australie, en Nouvelle-Zélande et au Canada ne possèdent pas d'enzyme B et sont par conséquent sensibles à l'association de l'amoxicilline avec l'acide clavulanique (94). Il a été

également observé que, même si les gènes codant ces bêta-lactamases sont présents, les deux enzymes ne sont pas toujours actives (95).

En règle générale, *Y. enterocolitica* est sensible à des antibiotiques communément utilisés lors d'infections à pathogènes Gram négatifs tels que les céphalosporines de troisième génération, la gentamicine, le chloramphénicol, les fluoroquinolones, le sulfaméthoxazole, ainsi que les pénèmes. Les résistances aux pénicillines, aux céphalosporines de première et de deuxième génération et à l'amoxicilline/acide clavulanique sont variables selon les souches. Un antibiogramme pratiqué avant tout traitement antibiotique peut aider au choix thérapeutique.

Les *Y. pseudotuberculosis*, quant à elles, ne possèdent pas de bêta-lactamases et sont sensibles à la plupart des antibiotiques communément utilisés en médecine (92). Mais des souches isolées chez certains animaux et oiseaux sont résistantes à la tétracycline, à l'érythromycine et au sulfaméthoxazole (23, 96, 97).

1.9 Le coût économique des yersiniooses

Il paraît difficile de pouvoir estimer précisément les coûts engendrés par les yersiniooses. Mais aux États-Unis, une estimation réalisée en 2011 attribue à *Y. enterocolitica* un coût moyen sur l'économie américaine de 11 334 dollars par cas donnant une estimation moyenne de 1,107 milliards de dollars par an (98). Ces estimations prennent en compte les différents frais médicaux (médecins, pharmaciens, analyses médicales, complications, hospitalisation...) mais aussi les coûts engendrés par un patient qui ne peut plus travailler. À titre de comparaison, sur trente-et-un agents pathogènes recensés et responsables de toxi-infections alimentaires, *Y. enterocolitica* se classe sixième en terme de coût économique malgré une faible incidence (tableau 1).

Agents pathogènes	Coût moyen en millions de dollars
<i>Salmonella</i>	11412
<i>Campylobacter</i>	6879
Norovirus	3677
<i>Toxoplasma gondii</i>	3456
<i>Listeria monocytogenes</i>	2040
<i>Shigella</i>	1554
<i>Yersinia enterocolitica</i>	1107
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	635
<i>Clostridium perfringens</i>	466
<i>Giardia intestinalis</i>	282
<i>Vibrio vulnificus</i>	268

Tableau 1 : Coût moyen sur l'économie américaine des principaux agents pathogènes recensés et responsables de toxi-infections alimentaires en 2010. D'après (98).

Une telle étude n'est pas disponible en France, mais il apparaît que le diagnostic des *Yersinia* entéropathogènes est particulièrement coûteux. Ainsi, une gélose CIN coûte 12 euros, ce qui à titre d'exemple est 70% plus cher qu'une gélose utilisée pour l'isolement des *Salmonella*.

En ce qui concerne *Y. pseudotuberculosis*, aucun chiffre n'est disponible. Cependant, la bactérie a un véritable impact économique lorsqu'elle touche les cheptels d'animaux d'élevages ou sauvages (45, 99, 100). C'est aussi un véritable fléau dans les parcs zoologiques et les réserves naturelles où la densité est grande et où elle peut engendrer des pertes considérables tant la valeur génétique et patrimoniale de chaque individu peut être grande (101).

2. Le bacille de la peste : *Yersinia pestis*

2.1 L'historique

La plus ancienne description de la peste fut sans doute donnée par la Bible dans laquelle une maladie avec des bubons est décrite (102). Des auteurs antiques ont également retracé d'autres épidémies se rapprochant de la peste autour du bassin méditerranéen (peste d'Athènes, peste antonine...) (103, 104). Cependant, il est difficile d'imputer formellement ces épidémies au véritable bacille de la peste, *Y. pestis*, car d'autres maladies infectieuses telles que la variole ou le typhus furent responsables à l'époque de maladies incurables et similaires. De plus, dans les textes anciens, la signification du mot latin *pestis* renvoie aux maladies contagieuses en général. Toutefois, depuis le début de l'ère chrétienne, trois grandes pandémies de peste bien documentées qui entraînèrent un nombre de décès évalué à 200 millions peuvent être attribuées avec certitude à *Y. pestis* (105).

2.1.1 La première pandémie : la peste de Justinien

La première pandémie fut nommée peste de Justinien du nom de l'empereur byzantin au pouvoir lorsque l'épidémie toucha son empire en 541 et Constantinople au printemps 542 (106). Elle se propagea dès 543 sur le reste du bassin Méditerranéen (Rome, Marseille...) et y persista jusqu'au VIII^{ème} siècle sous forme sporadique (figure 2) (106). L'analyse d'ADN ancien provenant de squelettes de cimetières bourguignons et bavares du VI^{ème} siècle indique bien la présence de *Y. pestis* (107, 108). Le récent génotypage de cette souche suggère que, bien qu'ayant transité par l'Afrique de l'Est, l'origine de cette première pandémie serait asiatique (109).

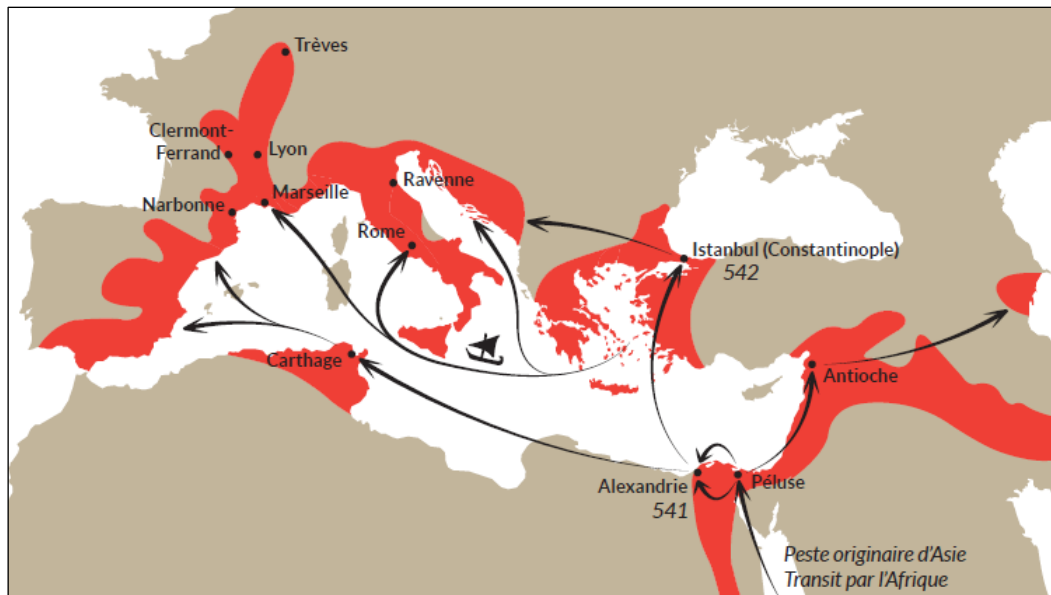


Figure 2 : Propagation de la peste de Justinien en Europe.
Source Jean-Noël Biraben, illustration Loïc Marleix.

La diminution de la population est estimée autour de 50% à 60% durant cette période (105). Cependant, la peste n'est pas la seule responsable de cette diminution car d'autres épidémies de variole furent également décrites en même temps. La peste de Justinien eut un impact majeur sur l'évolution économique, politique et religieuse de l'époque et fut une des causes de la chute de l'Empire Romain d'Orient qui marqua la fin de l'Antiquité (106).

2.1.2 La deuxième pandémie : la peste noire

Après un calme relatif, la peste fut de retour en Europe après s'être propagée depuis l'Asie centrale par les routes de la soie et du thé entre 1332 et 1346 (102). Une première épidémie de 1347 à 1351, plus connue sous le nom de peste noire, causa la mort de 17 à 28 millions de personnes, représentant 30% à 40% de la population de l'époque (figure 3). Elle pénétra ensuite dans toute l'Europe et y persista sous forme de vagues épidémiques jusqu'au XVIII^{ème} siècle (grande peste de Londres en 1665, grande peste de Marseille en 1720) (110).

Récemment, des études de paléomicrobiologie, réalisées sur des squelettes provenant de nombreux pays européens, apportèrent la preuve que *Y. pestis* fut bien la cause d'une pandémie à cette époque (111, 112).

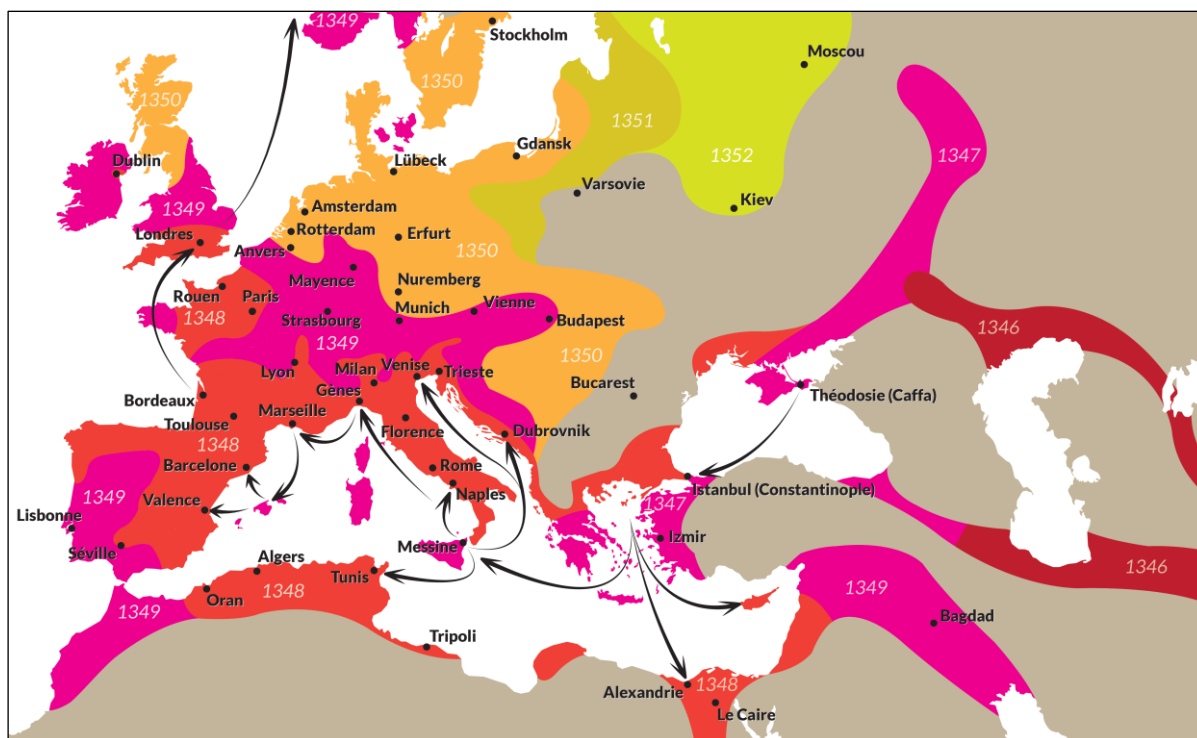


Figure 3 : Propagation de la peste noire au cours du XIV^{ème} siècle en Europe.
Source Jean-Noël Biraben, illustration Loïc Marleix.

2.1.3 La troisième pandémie et Alexandre Yersin

La troisième pandémie commença probablement en 1855 en Chine dans la province du Yunnan (102). Elle atteignit Hong Kong et Canton en 1894, ce qui marqua le début de cette troisième pandémie (113). Par le biais de la navigation à vapeur, elle dissémina vers des pays et des continents auparavant épargnés. Le Japon, Formose et le Moyen-Orient furent les premières régions touchées. La peste atteignit Bombay en 1898 et s'implanta de façon durable en Inde, où elle tua 12,5 millions de personnes jusqu'en 1918 (105). L'épidémie s'étendit à l'Europe, l'Australie, l'Afrique, et les Amériques du Sud et du Nord (figure 4) (102). Sa dissémination, qui a continué jusqu'à aujourd'hui, fut fortement diminuée grâce aux mesures efficaces de santé publique et l'utilisation d'antibiotiques dès le milieu du XX^{ème} siècle. Cependant, cette épidémie est toujours en cours et est actuellement établie de façon stable dans certains foyers sur tous les continents (105).

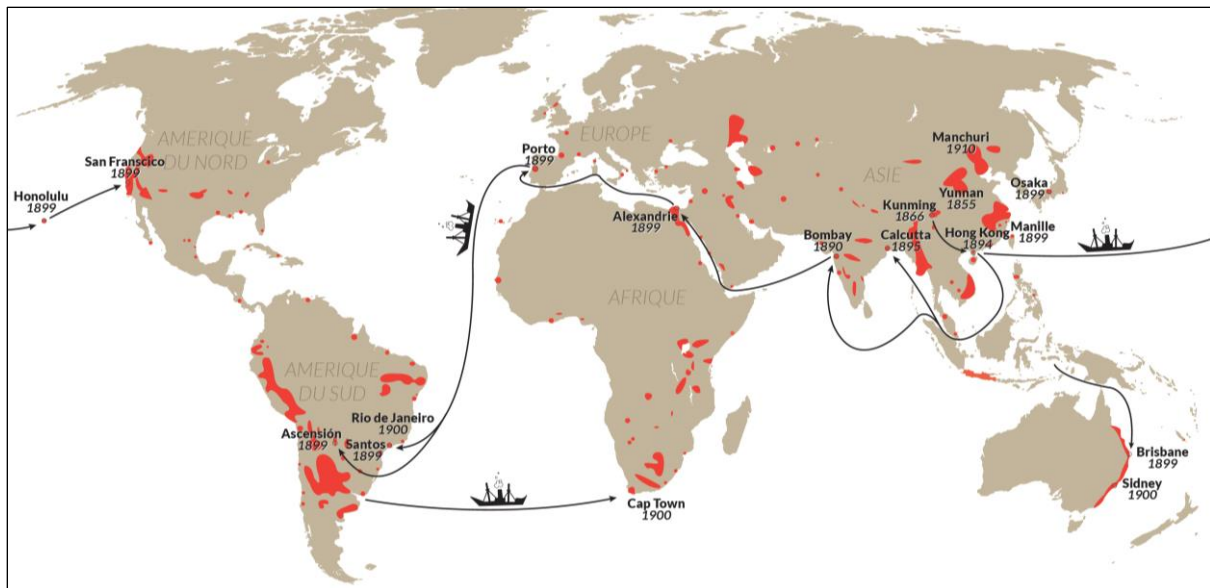


Figure 4 : Propagation de la troisième pandémie.
Source Jean-Noël Biraben, illustration Loïc Marleix.

Quand l'épidémie de peste atteignit Hong Kong en 1894, un docteur écossais de 28 ans, nommé James Alfred Lowson, fut le premier à formellement diagnostiquer la peste le 8 mai 1894 (114). Le 10 mai, Hong Kong fut déclaré port infecté. Bien qu'à cette époque de l'âge d'or de la microbiologie de nombreuses bactéries furent identifiées comme cause de maladies diverses, la peste n'avait toujours pas été étudiée. Avec l'apparition d'une épidémie, la maladie fut enfin accessible et des délégations furent envoyées par les gouvernements japonais et français (115). Le microbiologiste japonais, Shibasaburo Kitasato, arriva de Tokyo le 12 juin. Auparavant, il collabora durant sept ans avec l'un des fondateurs de la bactériologie, l'allemand Robert Koch, et fut rendu célèbre par ses travaux sur le tétanos. Dès son arrivée à Hong Kong, il reçut un accueil très chaleureux de la part du docteur Lowson qui lui permit d'accéder à de nombreux échantillons humains et de disposer d'un matériel de laboratoire récent. Le docteur Alexandre Yersin arriva le 15 juin. Suisse de naissance, il prit la nationalité française lorsqu'il travailla à Paris sous la direction de Louis Pasteur. Il se distingua par ses travaux sur la toxine diphtérique et la tuberculose qu'il réalisa avec Émile Roux, mais sa notoriété était moindre que celle de Kitasato. Arrivant d'Indochine où il était à présent médecin colonial, il ne reçut pas le même accueil chaleureux de la part du docteur Lowson, le britannique réservant les cadavres et le matériel à la délégation japonaise.

Malgré une différence flagrante de moyens entre les deux scientifiques, ils firent la découverte quasi simultanément d'un nouveau bacille. Dans une interview accordée au *China Mail* du 20 juin 1894, Kitasato décrivit l'isolement d'un bacille dans le sang (114). Le même jour, Yersin isola également un bacille à partir d'un bubon et en fit part dans une lettre délivrée à l'Académie des sciences le 30 juillet (116). Le 11 et le 25 août, le journal britannique *The Lancet* publia des notes préliminaires de Kitasato annonçant sa découverte (117). Le bacille responsable de la peste fut nommé bacille de Kitasato-Yersin.

Yersin continua ses travaux sur la peste en Inde et au Viêt Nam et plus particulièrement sur la sérothérapie (115, 118). Si le rôle du rat dans la transmission de la peste était bien reconnu, les modalités de sa contamination restaient vagues. De surcroît, les espoirs qu'autorisaient les premiers essais de sérothérapie et de vaccination faisaient passer au second plan l'épidémiologie de la peste. Cependant en 1897, suite à des travaux sur la peste à Formose, le japonais Masanori Ogata démontra que l'injection de broyats de puces de rats infectés transmettait la peste aux souris (102). C'est un autre pasteurien, Paul-Louis Simond, envoyé aux Indes en 1898 pour continuer la sérothérapie entreprise par Yersin, qui trouva la réponse définitive (119). Ayant aussi l'intuition que la peste pouvait être transmise par un insecte, il poursuivit des recherches dans ce sens. Elles aboutirent, le 2 juin 1898, par une expérience où il mit en évidence la transmission de la peste par la puce du rat au rat et par déduction du rat à l'homme (120). La publication de Simond n'entraîna pas une conviction unanime et reçut de nombreuses critiques car la notion d'insectes vecteurs était encore nouvelle. Elle fut pourtant confirmée en 1903 à Marseille par Gauthier et Raybaud qui réalisèrent une expérience similaire (121). En 1914, Arthur William Bacot et Charles James Martin découvrirent que le proventricule de certaines puces était bloqué par le bacille de la peste, les rendant ainsi plus efficaces dans la transmission de la peste (122). Enfin en 1927, Ricardo Jorge compléta les connaissances du cycle infectieux de la peste en identifiant le réservoir infectieux composé de rongeurs sauvages vivants et porteurs du bacille (102).

Au cours du XX^{ème} siècle, de nombreuses controverses apparurent au sujet de la primauté de la découverte du bacille de la peste (123). Il est aujourd'hui admis que, même si Kitasato découvrit un bacille quelques jours avant Yersin et le publia avant lui, sa description fut très imprécise. De plus, il semble probable que le premier isolement fut contaminé par des pneumocoques, faussant les descriptions suivantes. Kitasato fut incapable de dire si la coloration de Gram était positive ou négative, et il trouva que le bacille était mobile. Les nombreuses lacunes, contradictions et confusions apparues dans ses différents rapports ont totalement discrédité sa découverte. A la lecture du rapport de Yersin, il ne fait en revanche aucun doute que celui-ci isola bien le bacille responsable de la peste.

La nomenclature du bacille changea de nombreuses fois, passant de *Bacterium pestis* à *Bacillus pestis* en 1900 puis *Pasteurella pestis* en 1923 en référence au mentor de Yersin. Depuis 1974, le bacille porte le nom de *Yersinia pestis* en l'honneur de son découvreur (1).

2.2 Le cycle infectieux, les réservoirs et les vecteurs

2.2.1 Le cycle infectieux naturel de la peste

La peste est avant tout une zoonose qui affecte les rongeurs et qui existe dans des foyers naturels indépendamment de la présence de populations humaines (124). La transmission entre rongeurs s'effectue par l'intermédiaire des puces qui leurs sont associées mais aussi par contact ou

ingestion. Ces voies sont responsables du maintien de *Y. pestis* dans le réservoir animal. Les puces acquièrent le bacille lors d'un repas de sang infecté. L'infection chez la puce est limitée au canal alimentaire. *Y. pestis* n'est pas transmise horizontalement, et s'il y a une transmission verticale, des larves infectées artificiellement sont capables d'éliminer le bacille en moins de 24 heures (105). Par conséquent, le maintien de la peste dans la nature est dépendant de la transmission entre les puces et les mammifères du réservoir.

Lorsqu'une puce suce le sang d'un hôte infecté, *Y. pestis* s'installe dans le proventricule de la puce (125). Cette structure à spicules permet la rupture des hématies et prévient la régurgitation des repas (figure 5). En quelques jours, *Y. pestis*, qui est hébergée sur les spicules du proventricule, se multiplie et bloque finalement le passage du sang dans l'intestin (figure 6). Bien que la puce continue de se nourrir avec une avidité accrue à mesure que le temps passe, le sang ne peut plus entrer dans l'intestin et reste dans l'œsophage. Les puces bloquées à présent affamées ont tendance à piquer plus fréquemment. Lorsque la puce cesse de sucer à la fin d'un repas, l'œsophage se rétracte et le sang accumulé est conduit vers la blessure faite par la piqûre, y amenant *Y. pestis*. Le blocage du proventricule est un processus important pour la transmission car sans blocage, elle est plus rare. Au final, les puces bloquées meurent rapidement de faim et de déshydratation en quelques jours.

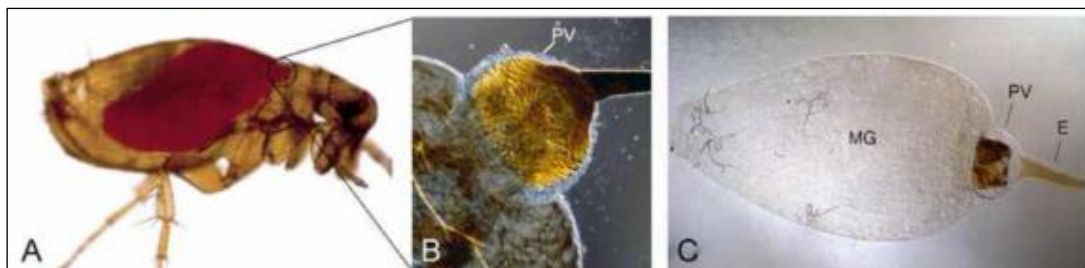


Figure 5 : Le tractus digestif de la puce. D'après (125). (A) Puce non infectée après un repas sanguin sain. (B et C) Dissection du tractus digestif d'une puce non infectée. E : œsophage ; PV : proventricule ; MG : intestin.

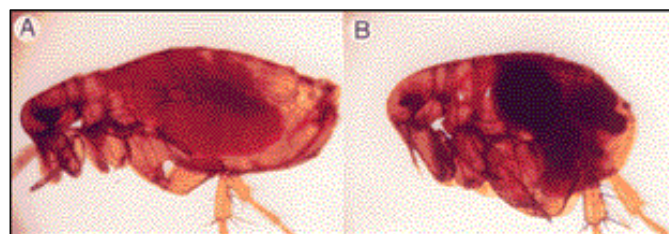


Figure 6 : Puces bloquée et non bloquée par *Y. pestis* après un repas sanguin sain. D'après (126). (A) La couleur rouge claire du sang dans l'œsophage et l'intestin indique une puce non bloquée. (B) La présence de sang frais uniquement dans l'œsophage et de produits de digestion de couleur rouge foncée dans l'intestin indiquent le blocage du proventricule.

Ce paradigme est bien décrit et indubitablement important. Cependant, il ne peut être en adéquation avec une transmission rapide caractéristique des épidémies de peste, particulièrement lorsque le temps d'incubation avant blocage est supérieur à deux semaines, rendant donc la période d'infectiosité de la puce très courte avant sa mort (127). Ainsi en 2006, il a été démontré que certaines espèces de puces étaient infectieuses quelques jours seulement après un repas sanguin contenant *Y. pestis* et cela sans être bloquées (128). Généralement, ces puces restent infectieuses durant quatre jours (129). Cette transmission alternative, sans blocage, rapide et tout aussi efficace est une explication plausible à la dissémination rapide du bacille.

Par la suite, le scénario admis suggère que *Y. pestis* circule par voie lymphatique entre le site de piqûre et le ganglion drainant, puis se multiplie pour former un bubon (105). Le bacille se dissémine par la circulation sanguine vers le foie et la rate où sa croissance continue. Puis le bacille atteint les autres organes. Le développement de cette septicémie est essentiel pour une transmission efficace de *Y. pestis* dans la nature car le cycle est achevé par l'infection de nouvelles puces lors d'un repas sanguin sur un rongeur septicémique.

Un point important des relations hôte-pathogène est que le parasite doit s'adapter pour minimiser les atteintes chez son hôte afin de s'assurer de la survie de sa niche de multiplication et de dissémination. *Y. pestis* peut causer des septicémies suffisantes chez les mammifères pour infecter les puces et peut bloquer celles-ci afin de rendre sa transmission plus efficace. Bien que de nombreux mammifères soient très sensibles et atteints de façon mortelle par la peste, certains sont plus résistants. Ces mammifères sont considérés comme des hôtes essentiels au maintien de la peste. Cependant, il apparaît aujourd'hui que le cycle de la peste est plus complexe que le schéma impliquant un réservoir de rongeurs et une transmission classique par un vecteur. D'autres schémas incluent l'utilisation d'autres mammifères, de puces non bloquées et/ou d'autres insectes comme les tiques en temps qu'hôtes et réservoirs alternatifs (130, 131). Le bacille serait également capable de survivre au sein de carcasses d'animaux infectés, offrant une voie alternative de transmission dans l'environnement (132).

L'existence d'un réservoir tellurique semble aussi être importante dans le cycle de *Y. pestis* (133). En effet, la capacité du bacille à survivre dans le sol de nombreuses années rend possible sa persistance dans l'environnement même lorsqu'aucun cas n'est observé chez les animaux (134, 135).

La contribution humaine au maintien de la peste a été de permettre sa dissémination au début de XX^{ème} siècle à travers le monde grâce aux voies de navigation empruntées par les bateaux à vapeur.

2.2.2 La dissémination de la peste à l'homme

La transmission à l'homme ne semble être qu'un accident dans le cycle infectieux de *Y. pestis* car l'homme ne joue aucun rôle dans la survie à long terme du bacille et est extrêmement sensible à la peste. Il peut s'infecter de manière directe ou indirecte (figure 7) (124).

La transmission indirecte est le mode de transmission le plus courant entre les rongeurs infectés et l'homme. Les puces infectées quittent les cadavres des rongeurs tués par la peste, cherchant un repas sanguin chez un autre hôte, elles peuvent ainsi piquer les êtres humains. Les humains infectés qui contractent la maladie peuvent à leur tour devenir infectieux. Jusqu'à la troisième pandémie, la transmission indirecte de la peste à l'homme par des rats issus de zones urbaines était la norme. Mais à présent, la majorité des cas de peste dans le monde est contractée à partir d'animaux sauvages comme les écureuils, les marmottes, les campagnols, les gerbilles, les chiens de prairie, les souris, les lapins (105). Bien que les puces des chats et des chiens domestiques puissent piquer les humains, ce ne sont pas des sources fréquentes de peste humaine.

Les humains peuvent s'infecter directement par contact avec des animaux. Le bacille peut pénétrer dans l'organisme par des lésions cutanées ou par les muqueuses de la bouche, du nez et des yeux. De rares cas isolés furent rapportés à la suite de la manipulation et la consommation de viande de chameaux, de chèvres, ou de cochons d'Inde (136, 137). L'homme peut aussi être exposé directement à des aérosols émis par certains animaux contaminés. C'est le cas du chat domestique qui peut s'infecter en consommant des rongeurs et qui est devenu aujourd'hui une source significative de cas humains (138).

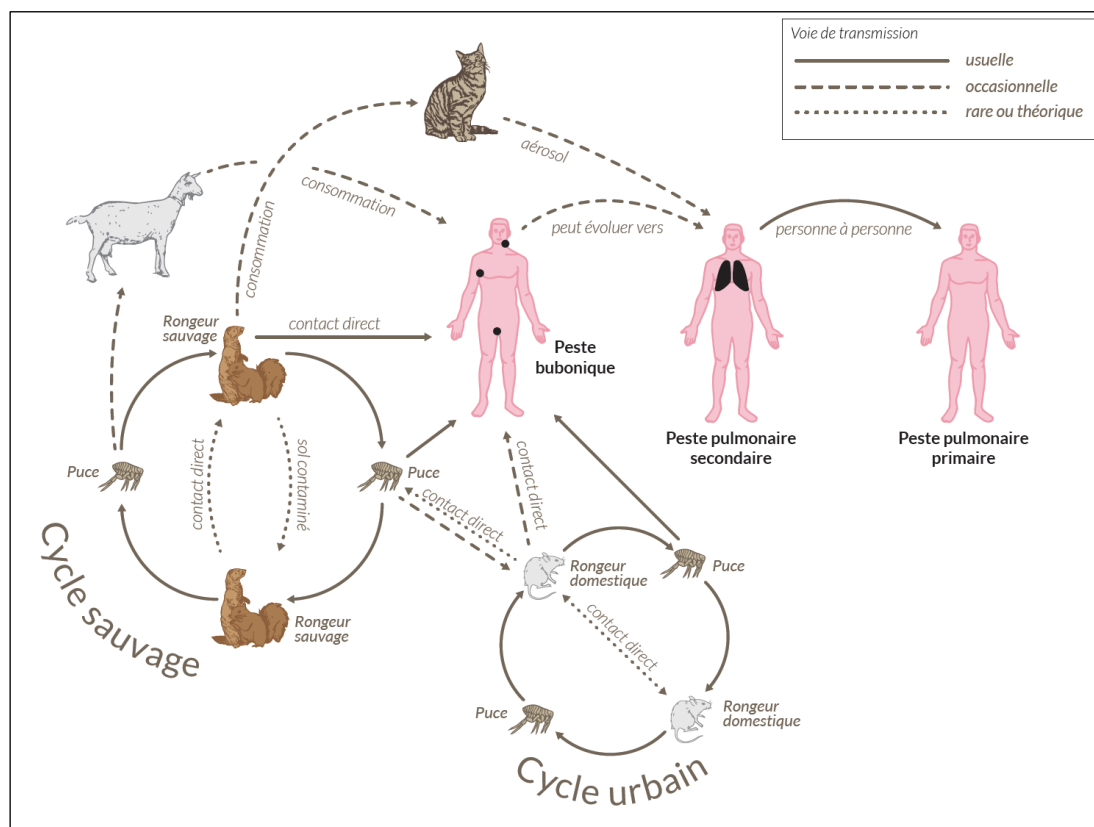


Figure 7 : Cycle infectieux de *Y. pestis* et voies de transmission à l'homme.
Source Neal R. Chamberlain, illustration Loïc Marleix.

Bien qu'extrêmement rare, il ne faut pas exclure une éventuelle contamination accidentelle du personnel scientifique travaillant sur la peste au sein de laboratoires de sécurité biologique de niveau 2 pour les souches de *Y. pestis* atténuées ou de niveau 3 pour les souches virulentes. En 2009, le décès d'un chercheur atteint d'hémochromatose et travaillant avec une souche atténuée aux États-Unis rappela la nécessité de suivre strictement les règles de sécurité lors de la manipulation en laboratoire (139).

2.2.3 Les animaux hôtes

Plus de 200 espèces de rongeurs (principalement les rats, les souris, les mulots, les écureuils, les marmottes, les campagnols, les cochons d'Inde, les gerbilles et les chiens de prairie) de lagomorphes et de mammifères seraient impliquées dans le cycle épidémiologique de la peste (105). La plupart de ces rongeurs sont des réservoirs potentiels mais leur réponse à l'infection est hétérogène. Le rat, qui a joué un grand rôle dans l'histoire de la peste, est toujours un réservoir au Viêt Nam, Myanmar, Chine, Inde, Indonésie, Madagascar et quelques zones en Afrique et Amérique du Sud (105). Il est intéressant de noter qu'on retrouve une plus grande incidence de peste humaine dans ces zones.

Les carnivores tels que les chiens, les furets, les putois, les ours noirs, les blaireaux, les coyotes, les ratons laveurs et les mouffettes sont résistants à la peste (105). Chez la plupart de ces espèces, l'ingestion de rongeurs infectés ne cause pas ou peu de symptômes et induit une séroconversion. Contrairement aux autres carnivores, les chats domestiques infectés oralement apparaissent malades et développent des bubons, une septicémie ou une forme pulmonaire (140), ce qui explique sans doute les nombreux cas de transmission de peste pulmonaire du chat à l'homme. Une sensibilité similaire est suspectée chez les félins sauvages avec notamment la mort de lynx sauvages au Colorado (141).

Les animaux hôtes de la peste sont classés en hôtes enzootiques (maintien) comprenant des rongeurs relativement résistants à la peste et en hôtes épizootiques (amplification) (124). Comme la plupart des foyers naturels de peste existent depuis longtemps, il est clair qu'une fraction de la population réservoir doit survivre à l'infection. Chez certaines espèces, l'infection peut continuer à circuler avec une létalité relativement faible. De plus, il semble que des animaux infectés avant une période d'hibernation survivent et peuvent initier une épizootie le printemps suivant, continuant l'épidémie de peste après l'hiver.

2.2.4 Les animaux vecteurs : les puces

Plus de 2 500 espèces de puces ont été identifiées. Bien que le rôle de vecteur de la peste n'a été prouvé que pour 80 d'entre-elles, toutes les espèces sont biologiquement capables de transmission (142). Pour jouer un rôle efficace de vecteur de la peste, la puce doit pouvoir ingérer *Y. pestis* avec son repas sanguin.

De par son rôle historique, la puce du rat *Xenopsylla cheopis* est considérée comme le vecteur classique (143) et le plus efficace expérimentalement (129). *X. cheopis* est fréquemment trouvée sur d'autres espèces de rongeurs des zones urbaines et une incidence élevée de *X. cheopis* infectées par la peste dans un foyer augmente de manière significative le risque de transmission aux êtres humains.

En dépit de son nom, la puce de l'homme *Pulex irritans*, a une grande variété d'hôtes (144). *P. irritans* a été considérée comme un vecteur possible ou probable de la peste mais son rôle est controversé. Bien qu'on l'implique rarement dans la transmission interhumaine, certains lui donnent un rôle essentiel dans les épidémies (145).

2.2.5 Les foyers de peste

Le pathogène responsable de la maladie, *Y. pestis*, circule au sein de réservoirs animaux, en particulier les rongeurs, dans les foyers naturels permanents situés sur une large ceinture à des latitudes tropicales et subtropicales ainsi que dans les zones les plus chaudes des latitudes tempérées du globe, entre le 55^{ème} parallèle nord et le 40^{ème} parallèle sud. Toutefois, à l'intérieur de ces limites, de nombreuses régions sont exemptes de foyers naturels de peste, notamment les zones désertiques où les rongeurs sont absents ou peu nombreux (124). Tous les foyers ne sont pas clairement définis car peu d'études de terrains permettent de distinguer les hôtes enzootiques des zones épizootiques. De plus, certaines zoonoses peuvent durer des années par dissémination à de nouvelles colonies conduisant à les classer de façon erronée comme foyer permanent. Finalement, la maladie chez les hôtes enzootiques est assez inapparente par rapport au taux de mortalité dramatique chez des hôtes plus susceptibles. Un foyer naturel de peste peut rester silencieux durant de nombreuses années, au cours desquelles aucun cas humain ne sera signalé. Par la suite, pour des raisons qui peuvent inclure notamment des changements écologiques, des mouvements de populations humaines ou l'apparition d'une épizootie, le foyer s'enflammera brusquement et des cas de peste humaine pourront se produire. La survenue d'un tremblement de terre est aussi une des raisons avancées à la réactivation de foyers silencieux (146).

De nombreux foyers géographiques sont répartis en Afrique et sur l'île de Madagascar faisant de ce continent la plus grande zone mondiale de peste zoonotique (124). Le foyer nord-américain est le plus grand du monde. Il s'étend du sud-ouest des États-Unis à la côte pacifique, incluant les états de Californie, de l'Oregon, du Nevada, du Nouveau-Mexique, de l'Arizona, du Colorado et de l'Utah,

avec parfois la détection d'animaux infectés jusqu'au Canada, au Mexique et au Texas (147). On retrouve également des foyers au Moyen-Orient, en Asie et en Amérique du Sud (124). On ne retrouve actuellement plus de foyers en France, en Europe de l'Ouest et en Océanie. Cependant la possibilité de cas importés par l'intermédiaire d'animaux infectés ou de personnes en phase d'incubation provenant d'une zone d'endémie est toujours probable (47).

2.3 L'épidémiologie et la répartition de la peste

2.3.1 L'épidémiologie

La peste était une des affections humaines « quaranténaires » soumises au Règlement Sanitaire International (RSI) et sa notification à l'OMS était obligatoire (148). Or, depuis l'entrée en vigueur d'un nouveau RSI en juin 2007, cette exigence a changé (149). Aujourd'hui, le RSI révisé exige la notification à l'OMS de tout événement susceptible de constituer une urgence de santé publique de portée internationale, par exemple l'apparition de la peste dans une zone où elle n'était pas connue pour être endémique. On peut cependant obtenir des données sur la survenue de la peste à travers les services nationaux de santé propres à chaque pays.

D'après le dernier rapport de l'OMS, paru en février 2010, le nombre de cas de peste humaine entre 2004 et 2009 s'élève à 12 503 cas dont 843 mortels (tableau 2) (149). En Afrique, 12 209 cas dont 814 mortels ont été déclarés dans sept pays (Algérie, République démocratique du Congo, Lybie, Madagascar, Ouganda, Tanzanie et Zambie), soit 97,6% du nombre total de cas notifiés dans le monde et 96,6% du nombre total de décès dans le monde. En Asie, ce sont 149 cas dont 23 mortels qui ont été déclarés dans quatre pays (Chine, Inde, Indonésie et Mongolie). Enfin, sur le continent américain, 145 cas dont 6 décès ont été notifiés par deux pays (États-Unis et Pérou).

Ce nombre est resté stable dans le monde et, comparé aux autres maladies infectieuses, il peut être considéré comme faible. Cependant, la peste n'en demeure pas moins un problème de santé publique dans le monde entier car ce nombre est sans doute sous-estimé. Deux raisons expliquent cela : certains pays sont peu enclins à déclarer les cas de peste ou bien la maladie n'est pas toujours diagnostiquée de par un tableau clinique peu spécifique et un manque de moyens de confirmation dans certains laboratoires. En outre, de nombreux pays ont démantelé leurs systèmes de surveillance de la peste, faute de cas humains. Toutefois, les données de l'OMS sont précieuses et permettent de se faire une idée générale de la répartition de la peste et de la tendance mondiale.

Au cours de ces 23 dernières années (de 1987 à 2009), 53 426 cas de peste dont 4 064 décès ont été notifiés par 26 pays (figure 8). Durant cette période, le nombre le plus élevé de cas et de décès a été enregistré en 1997 (5 419 cas dont 274 décès), le plus faible nombre de cas en 1989 (876 cas) et de décès en 2009 (72 décès). Quatre pays ont notifié la présence de peste humaine chaque année entre 2004 et 2009. Il s'agit des États-Unis, de Madagascar, du Pérou et de la République démocratique du

Congo. Depuis le début des années 90, on observe une augmentation de l'incidence de la peste humaine, la hausse étant particulièrement sensible en Afrique. Les raisons de cette tendance peuvent être attribuées à une augmentation effective de la peste zoonotique dans ses foyers naturels et à l'amélioration de la notification à l'OMS par les pays membres (150). L'analyse de la répartition de la peste démontre que la situation à Madagascar et en République démocratique du Congo influence fortement les données épidémiologiques globales.

Les dernières alertes d'épidémies de peste émises par l'OMS concernent les régions suivantes : Inde en 2002, Algérie en 2003, République démocratique du Congo en 2005 et 2006, Chine en 2009 et Pérou en 2010 (151). En France, les dernier cas déclarés datent de 1920 à Paris et de 1945 en Corse (47).

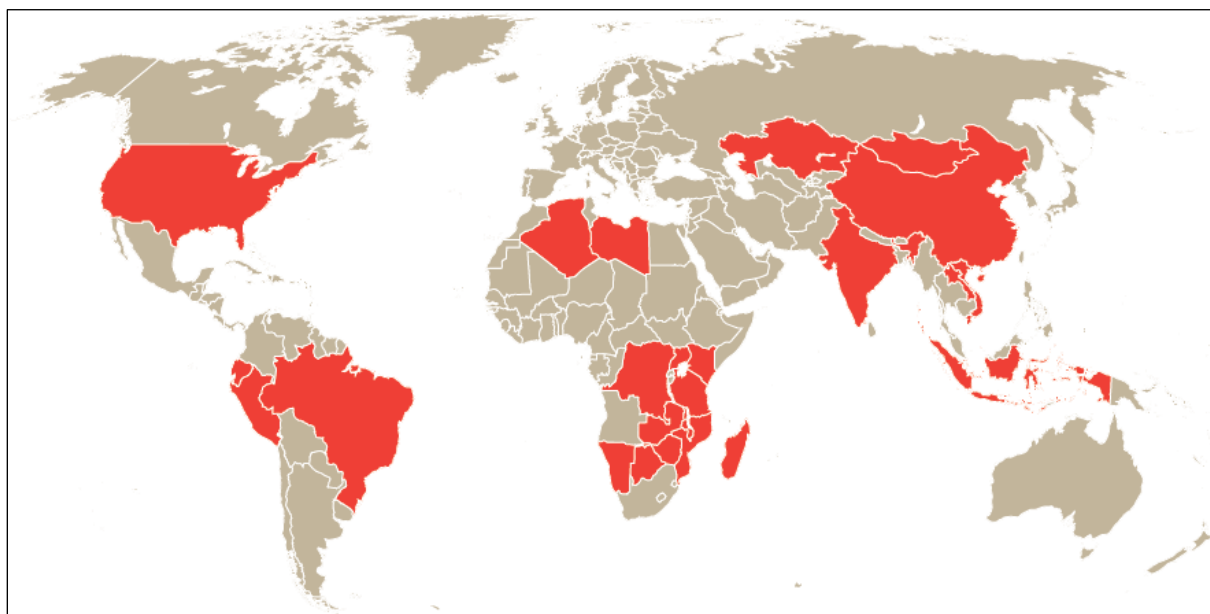


Figure 8 : Pays ayant reporté des cas de peste humaine entre 1987 et 2009.
Source OMS, illustration Loïc Marleix.

	1987	1988	1989	1990	1991	1992	1993	1994	1995	1996	1997	1998	1999	2000	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009
AFRIQUE																							
Algérie.....	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	-	-	-	4	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	4	-	-	-	-	1	-
Botswana.....	-	-	103	70	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	9	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
République démocratique du Congo	474	369	1	-	289	390	636	82	582	-	-	95	90	371	509	798	1092	1042	1434	1789	966	1962	618
	160	86	-	-	28	140	89	10	23	-	-	42	29	63	52	72	68	58	99	119	47	52	27
Kenya.....	-	-	-	44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lybie.....	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1
Madagascar.....	23	93	170	226	137	198	147	126	1147	1629	2863	1473	1304	1333	804	658	933	1214	421	412	583	535	289
	4	19	41	55	30	26	23	15	26	109	176	115	132	113	66	96	109	98	35	51	71	71	38
Malawi.....	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-	582	-	74	78	-	92	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	11	-	4	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-
Mozambique.....	-	-	-	-	-	-	216	-	-	825	430	316	451	73	45	31	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	3	-	-	18	4	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Namibie.....	146	31	116	169	1092	458	42	4	-	-	-	131	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	10	45	13	1	-	-	-	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ouganda.....	-	-	-	-	-	167	-	-	-	-	-	49	-	202	319	60	24	-	-	24	277	40	26
	-	-	-	-	-	18	-	-	-	-	-	16	-	50	42	2	2	-	-	6	29	4	1
Tanzanie.....	356	647	31	364	1293	16	18	444	831	947	504	286	420	74	2	19	-	-	-	-	59	74	2
	34	33	4	32	60	2	-	50	74	64	28	3	15	1	2	-	-	-	-	-	1	4	-
Zambie.....	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	319	-	-	-	850	-	-	-	-	-	425	34	-
	1	-	-	-	-	-	-	-	-	26	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	2	-	-
Zimbabwe.....	-	-	-	-	-	-	392	-	-	8	8	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	28	-	-	2	2	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	1000	1140	421	873	2761	1062	1010	1273	2560	2576	5101	2341	2344	2509	2557	1672	2091	2256	1855	2225	2310	2649	940
	199	138	54	108	163	181	131	106	123	173	261	182	196	227	165	171	180	156	134	176	150	132	67
AMERIQUES																							
Bolivie.....	2	2	-	10	-	-	-	-	26	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1	-	-	2	-	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Brésil.....	43	25	26	18	10	25	-	4	9	1	-	4	6	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Equateur.....	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pérou.....	31	10	-	18	-	120	611	420	97	23	39	1	22	17	12	9	19	8	16	25	26	28	25
	6	5	-	4	-	4	31	19	2	-	-	-	-	-	1	-	-	-	1	-	1	-	-
Etats-Unis d'Amérique..	12	15	4	2	11	13	10	14	9	5	4	9	9	6	2	2	1	3	8	17	7	3	8
	2	-	-	-	-	2	1	2	1	2	1	-	1	-	-	-	-	1	-	2	2	-	-
TOTAL	88	52	30	48	21	158	621	438	115	55	44	28	37	25	14	11	20	11	24	42	23	31	33
	9	5	-	6	-	6	32	21	3	6	1	14	1	-	-	1	-	1	-	2	2	1	2
ASIE																							
Chine.....	7	6	10	75	29	35	13	7	8	98	43	-	16	25	79	68	13	21	5	-	2	2	12
	2	4	6	2	11	6	1	4	-	7	-	-	5	2	7	-	1	9	2	-	1	2	3
Inde.....	-	-	-	-	-	-	-	876	-	-	-	-	-	-	-	16	-	8	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	54	-	-	-	-	-	-	-	4	-	3	-	-	-	-	-
Indonésie.....	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6	-	-	-	1	1	2	7	11	4	71	3	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
Kazakhstan.....	2	4	1	-	3	-	-	-	1	-	7	-	2	1	3	-	-	-	-	-	-
	1	2	-	-	1	-	-	-	-	-	2	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Laos.....	7	3
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mongolie.....	5	15	3	12	21	-	1	6	4	10	4	10	8	6	10	-	-	-	2	1	-
	3	3	...	4	7	-	1	-	2	6	2	3	2	2	1	-	-	-	1	1	-
Myanmar.....	5	8	34	6	100	528	87	6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	2	-	1	3	...	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Viêt Nam.....	107	196	374	405	94	437	481	339	170	279	220	85	195	22	13	8	-	-	-	-	-	-	-
	6	6	37	20	3	17	19	27	10	19	10	7	6	-	-	-	-	-	-	-	-
TOTAL	119	210	425	505	227	1012	605	1228	186	386	274	95	222	57	103	100	28	36	16	4	75	6	12
	8	10	49	29	15	30	28	85	11	26	12	13	15	5	10	6	2	12	2	-	3	3	3
TOTAL MONDIAL	1207	1402	876	1426	3009	2232	2236	2939	2861	3017	5419	2464	2603	2591	2674	1783	2139	2303	1895	2271	2408	2686	985
	216	153	103	141	178	217	191	212	137	205	274	209	212	232	175	178	182	169	139	136	155	136	72

Tableau 2 : Peste humaine, nombre de cas et de décès notifiés dans le monde de 1987 à 2009 (149). Nombre de cas en noir ; nombre de décès en gris. (-) Aucun cas ou décès notifié (...) Chiffre non disponible

2.3.2 La réémergence

L'absence de peste chez l'homme dans certaines régions ne doit pas être un motif pour diminuer la vigilance car une des caractéristiques de la peste est sa capacité à « s'éteindre » pendant plusieurs années avant de réapparaître brutalement sous forme épidémique (152). L'absence de peste humaine peut simplement signifier que les contacts humains avec le bacille circulant dans la nature ont été réduits (149). Ainsi au cours de ces dernières années, des flambées de peste humaine ont été observées dans différentes zones géographiques après des périodes muettes de plusieurs dizaines d'années.

En Inde, une épidémie de peste pulmonaire a éclaté en 1994 alors que l'on croyait la maladie éradiquée depuis presque 30 ans, entraînant 876 contaminations dont 54 mortelles (153). Presque simultanément, des cas de peste bubonique ont été enregistrés au Mozambique après plus de 15 ans de silence, et la propagation toucha le Zimbabwe et le Malawi tout proches. Presque au même moment, une épidémie est survenue au Pérou. Malgré leur apparition rapprochée dans le temps, il n'existe probablement pas de lien épidémiologique entre les épidémies asiatique, américaine et africaine. La peste est également réapparue en Jordanie en 1997 après 80 ans d'absence. Récemment en 2003, la peste est réapparue en Algérie, dans la région d'Oran, après une période de silence inter-épidémique de 50 ans. Enfin en 2009, la peste est de retour en Lybie après 25 années d'absence sans rapport avec l'épidémie algérienne (154).

Le cycle infectieux de *Y. pestis* étant influencé par certaines conditions climatiques, de nombreux scientifiques pensent que les changements climatiques auxquels nous faisons face aujourd'hui peuvent favoriser la réémergence de la peste dans certaines régions comme en Asie centrale ou aux États-Unis (155, 156).

2.4 La physiopathologie

Le bacille de la peste est une des bactéries les plus pathogènes au monde pour l'homme. Chez la souris de laboratoire, la dose létale à 50%, c'est à dire le nombre de bactéries nécessaires pour causer la mort de la moitié de la population animale infectée (DL₅₀) est de seulement une bactérie par voie intraveineuse et de moins de dix bactéries par voie sous-cutanée.

Il a été proposé que *Y. pestis* migre du point d'inoculation vers les ganglions drainants grâce aux macrophages à l'intérieur desquels elle peut survivre et se multiplier *in vitro* (157). La bactérie échapperait ainsi à la réponse immunitaire et notamment aux neutrophiles au début de l'infection (12, 158). À la suite de l'étape de dissémination, *Y. pestis* se réplique dans des tissus infectés sous forme extracellulaire (105). La transition entre l'étape intracellulaire et extracellulaire n'est pas totalement comprise mais implique de nombreux gènes régulés par le changement de température qui passe de 26°C chez la puce à 37°C chez l'homme (159, 160).

2.5 Les manifestations cliniques

Chez l'homme, l'infection à *Y. pestis* se présente généralement sous l'une des trois formes cliniques primaires : la forme bubonique, septicémique ou pulmonaire. D'autres formes cliniques telles que la forme septicémique secondaire, la forme pulmonaire secondaire, la peste méningée, l'endophtalmie pesteuse et des affections multiples des ganglions lymphatiques résultent également de la dissémination bactériémique du bacille. Les principales formes cliniques sont décrites ci-dessous (12, 105, 124).

2.5.1 La peste bubonique

La peste bubonique est la forme classique de la maladie qui se déclare à la suite d'une contamination avec *Y. pestis* par la piqûre d'une puce ou l'exposition d'une lésion cutanée ouverte à du matériel infecté. Une prolifération cutanée locale, généralement non apparente sur le plan clinique, suit l'inoculation. Dans certains cas, des lésions de la peau peuvent survenir au site d'entrée. L'infection se propage vers les ganglions lymphatiques drainants, provoquant une inflammation et l'enflure d'un ou de plusieurs nodules appelés bubons. Une légère douleur au niveau des ganglions lymphatiques drainants peut parfois se faire ressentir avant l'apparition d'un bubon. Les bubons peuvent survenir n'importe où au niveau des aires ganglionnaires, notamment dans les ganglions inguinaux, axillaires, sus-claviculaires, cervicaux, rétro-auriculaires, épitrochléens, poplités ou pharyngés. Des ganglions plus profonds, comme ceux situés dans l'abdomen ou le thorax, peuvent aussi être atteints par voie lymphatique ou hématogène.

Après deux à six jours d'incubation, les malades développent généralement de façon soudaine des symptômes tels que fièvre, céphalée, frissons et douleurs au niveau des ganglions lymphatiques enflés. De plus, des symptômes gastro-intestinaux tels que nausées, vomissements et diarrhées sont fréquemment rencontrés.

Sans traitement, l'infection se propage, donnant de sérieuses complications telles qu'une méningite, une forme septicémique secondaire ou une pneumonie appelée forme pulmonaire secondaire.

2.5.2 La peste septicémique

La forme septicémique primaire se déclare à la suite d'une pénétration directe du bacille de la peste dans le sang, par une coupure, une blessure ou par passage à travers les muqueuses. Elle se définit par la présence de cultures bactériennes positives dans le système sanguin de patients ne présentant pas de lymphadénopathies. Cliniquement, la forme septicémique est semblable aux septicémies causées par des bactéries Gram négatif. Les patients sont fébriles avec, dans la plupart des

cas, frissons, céphalées, malaises, hypotension et symptômes gastro-intestinaux. Des douleurs abdominales sont plus fréquemment retrouvées que lors des cas de peste bubonique. La peste septicémique, qu'elle soit primaire ou secondaire à la peste bubonique, peut conduire à l'infection d'autres organes. Les complications en sont notamment la peste pulmonaire secondaire, la peste méningée, la peste endophtalmique, des abcès hépatiques ou spléniques, ou une lymphadénopathie généralisée.

Le terme de forme septicémique peut prêter à confusion car la plupart des patients souffrant des formes buboniques et pulmonaires déclarent également une septicémie détectable lors de l'évolution de la maladie. Le débat pour savoir si la forme septicémique est une forme primaire ou si c'est une forme secondaire des autres, n'est pas clôt. Cependant, certaines expériences avec des souris infectées par des puces vont dans le sens de l'existence d'une forme septicémique primaire, sans les changements histologiques se produisant dans les ganglions lymphatiques lors de la forme bubonique (161).

2.5.3 La peste pulmonaire

La peste pulmonaire primaire résulte de l'inhalation par voie aérienne de gouttelettes contenant *Y. pestis* généralement lors d'un contact rapproché avec un malade ayant développé une forme pulmonaire. La période d'incubation est généralement de quelques heures à trois jours. Elle progresse rapidement passant de symptômes grippaux (fièvre, dyspnée, myalgie, douleurs à la poitrine) à une pneumonie sévère avec toux et production de crachats sanguinolents, dyspnée, hypoxie et hémoptysie. D'autres symptômes tels qu'une douleur généralisée, des diarrhées, une agitation, des délires et le coma peuvent apparaître. Les symptômes sont de plus en plus prononcés au fur et à mesure de l'évolution de la maladie.

La forme pulmonaire primaire est rare et impose une distance d'au minimum deux mètres d'une personne qui tousse. La forme pulmonaire secondaire résulte de l'extension hématogène de *Y. pestis* vers les poumons chez des malades atteints de la forme bubonique ou septicémique. Généralement, le taux de mortalité chez les patients développant la forme pulmonaire est proche des 100% sans traitement antibiotique entrepris dans les 18-24 heures qui suivent le début de la maladie. Même si le traitement est entrepris à temps, le taux de mortalité reste supérieur à 50%.

2.5.4 La peste pharyngée et la peste méningée

Des formes de peste, plus rares, ont également été décrites.

La peste pharyngée résulte de la contamination de l'oropharynx par *Y. pestis*. Les sources de contamination reconnues sont notamment les gouttelettes respiratoires expulsées par la toux d'un patient ou d'un animal souffrant d'une infection pesteuse respiratoire ou l'ingestion de tissus animaux infectés crus ou insuffisamment cuits (162). La peste pharyngée est cliniquement similaire à une pharyngite à streptocoques ou virale.

La peste méningée se caractérise par les symptômes suivants : fièvre, céphalées, raideur de la nuque, délires, confusion, altération des facultés puis coma. La peste méningée peut se manifester sous forme primaire, mais elle se produit habituellement une semaine ou plus après le début de la forme bubonique ou septicémique. Elle est souvent associée à une antibiothérapie tardive, inappropriée, bactériostatique ou qui ne pénètre pas facilement la barrière hémato-encéphalique, comme lors de l'utilisation de tétracyclines.

2.6 Le diagnostic

Le diagnostic clinique de la peste est généralement basé sur les symptômes et l'historique du patient. La forme bubonique est suspectée chez des patients présentant un ganglion enflé et douloureux, de la fièvre, de la fatigue, et ayant été exposés à des puces, rongeurs ou autres animaux susceptibles d'être infectés. La forme septicémique est plus difficile à diagnostiquer de par la ressemblance des symptômes à ceux des septicémies causées par les bactéries Gram négatif, tout comme la forme pulmonaire qui peut être confondue avec des syndromes pulmonaires différents. On peut suspecter plus facilement une forme pulmonaire chez des personnes ayant été en contact avec des animaux domestiques, et plus particulièrement des chats. Dans tous les cas, des échantillons biologiques doivent être obtenus avant le début d'un traitement afin de réaliser un diagnostic en laboratoire. Cependant, le traitement ne doit pas être retardé par l'attente des résultats du laboratoire.

Le diagnostic est posé à partir des preuves bactériologiques et/ou sérologiques (47).

Le diagnostic bactériologique classique comprend l'analyse des caractères cultureux, l'isolement et la caractérisation du bacille, et apporte ainsi un diagnostic de certitude. Les échantillons biologiques utilisables peuvent être du sang, la ponction du bubon, des crachats, le liquide cébrospinal en cas de peste avec méningite et le prélèvement des lésions cutanées présentes. Des biopsies *post mortem* d'organes peuvent également être analysées. La température optimale de croissance de *Y. pestis* se situe entre 25 et 28°C. Cependant la croissance est possible de 4 à 42°C. Il faut 48 h pour obtenir des colonies de 1 mm à 25°C. *Y. pestis* est facilement masquée par d'éventuels contaminants en raison de sa lenteur de croissance. L'identification peut être réalisée après la culture et l'isolement de la bactérie par des techniques de coloration ou d'immunofluorescence. Le diagnostic

bactériologique est également réalisé par l'analyse des caractères biochimiques. En effet, *Y. pestis* se caractérise par une activité oxydase négative, catalase positive, urée négatif, indole négatif et lactose négatif. Enfin, la lyse par des bactériophages spécifiques peut également être réalisée dans certains laboratoires (163). Une fois la souche identifiée, son biovar est déterminé à l'aide de tests phénotypiques. Cependant, le diagnostic bactériologique reste tardif car il nécessite au minimum quatre jours pour permettre l'isolement du bacille (164).

Bien que moins rapide que le diagnostic bactériologique, l'analyse sérologique est souvent utilisée rétrospectivement afin de confirmer une suspicion de peste. La recherche d'anticorps spécifiques de *Y. pestis* est réalisée dans le sérum des patients. La séroconversion peut se produire cinq jours après le début des symptômes mais arrive plus habituellement une à deux semaines après ceux-ci (12).

Le typage moléculaire de la souche de *Y. pestis* peut être obtenu à l'aide de cinq techniques principales : par ribotypage, par 3 IS-RFLP, PFGE, MLVA ou CRISPR (165).

La précocité du diagnostic étant cruciale pour la prise en charge du patient et la mise en œuvre de mesures prophylactiques pour l'entourage, un diagnostic rapide est nécessaire. Des méthodes de diagnostic telles que l'ELISA ou des tests de type bandelette sont fiables, rapides et reproductibles (166, 167). Leur utilisation rapide à partir de nombreux échantillons biologiques représente un progrès dans le diagnostic précoce sur le terrain. La technique d'hybridation ADN peut être utilisée sur le terrain mais sa limite de détection ne permet pas de l'employer comme moyen diagnostic en laboratoire. Les techniques de PCR ont l'avantage d'être rapides et sensibles mais ne peuvent pas être utilisées dans les conditions de terrain. Elles ne sont actuellement pas pratiquées en routine. Des études récentes ont également mis en valeur les techniques de spectrométrie de masse avec notamment les instruments de type MALDI-TOF (168). Aujourd'hui, le diagnostic de la peste est devenu un vrai challenge car la plupart des cas humains apparaissent dans des zones ne disposant que de laboratoires peu équipés. Le développement récent de moyens de diagnostic rapides, et plus particulièrement des bandelettes, offre de nouvelles possibilités pour surveiller et confirmer les cas de peste en zone épidémique (164, 169).

Chaque suspicion de peste doit être rapportée aux autorités de santé compétentes selon la réglementation en vigueur dans chaque pays. En France, la peste est une maladie à déclaration obligatoire (170). Les médecins et les biologistes qui suspectent ou diagnostiquent une des maladies à déclaration obligatoire doivent la signaler sans délai au médecin de l'Agence Régionale de Santé (ARS) de leur lieu d'exercice. Dans le cas de la peste, un diagnostic doit être effectué pour confirmation par le CNR. Si le cas est confirmé, il doit faire l'objet d'une notification au moyen d'une fiche au ministère de la santé qui assure par la suite la déclaration internationale à l'OMS.

2.7 Le traitement antibiothérapique de la peste

2.7.1 L'antibiothérapie

Les antibiotiques furent introduits pour la première fois dans le traitement de la peste en 1938. C'est le Prontosil, premier médicament antibactérien sulfamidé commercial, qui fut utilisé avec succès par John Carman avec une diminution de la mortalité de 50%. À la suite de la découverte de la streptomycine en 1943, elle fut d'abord testée chez les souris et il apparut que ce traitement était très efficace. Dès 1946, la streptomycine fut utilisée dans le traitement chez l'homme, suivie quelques années plus tard par les tétracyclines (102).

Aujourd'hui, lorsqu'un cas de peste est suspecté sur des bases cliniques et épidémiologiques, il convient d'instaurer une thérapie antimicrobienne spécifique sans attendre une réponse définitive du laboratoire. Les patients sans symptôme de pneumonie, chez lesquels on suspecte la peste, doivent être placés en isolement et des précautions doivent être prises pour éviter la propagation par voie aérienne. Le traitement curatif de la peste repose sur des antibiothérapies recommandées par l'OMS (124).

La streptomycine est utilisée depuis plus de 50 ans pour traiter la peste et reste aujourd'hui l'antibiotique de référence. Par son effet bactériolytique, elle doit être administrée avec précaution afin d'éviter un éventuel choc endotoxique. Le traitement se déroule sur une durée de dix jours. Un autre aminoglycoside, la gentamicine, peut aussi être utilisé, notamment en cas de traitement lors d'une grossesse.

L'utilisation du chloramphénicol est recommandée en association avec un aminoglycoside en cas de peste avec méningite pour son passage de la barrière hémato-encéphalique.

Les tétracyclines peuvent également être utilisées avec efficacité mais uniquement dans des cas sans complication à cause de leur action seulement bactériostatique (171).

Les sulfamides ont largement été utilisés dans le traitement de la peste. Cependant, il apparaît que le taux de mortalité est plus élevé et les complications plus fréquentes que lors de l'utilisation des antibiotiques déjà cités.

Les antibiotiques de la classe des fluoroquinolones, et notamment la ciprofloxacine, ont été testés avec succès lors d'infections expérimentales chez l'animal et apparaissent aujourd'hui comme des options thérapeutiques intéressantes.

Y. pestis est sensible aux pénicillines et notamment à l'amoxicilline qui peut être utilisée pour le traitement. Les céphalosporines de troisième génération telles que le cefotaxime et la ceftriaxone sont également utilisés. Enfin, les macrolides ne sont pas considérés comme des antibiotiques efficaces dans le traitement de la peste.

Les proches contacts des patients atteints de peste pulmonaire ou les personnes qui pourraient avoir été exposées à des puces, à des liquides organiques ou des tissus d'un mammifère infecté par *Y. pestis*, ou encore lors de l'exposition accidentelle en laboratoire à des matériels infectieux, doivent

recevoir une antibiothérapie prophylactique. Ce traitement repose sur l'utilisation de tétracyclines, de sulfamides ou du chloramphénicol.

2.7.2 L'antibiorésistance

Les souches de *Y. pestis* antibiorésistantes sont rares. Cependant, on sait depuis peu que le risque d'apparition d'antibiorésistances existe. En 1995, deux souches portant des plasmides de résistance à des antibiotiques de première ligne ont été isolées à Madagascar chez des patients atteints de peste bubonique (172). Un de ces plasmides conférait un taux de résistance important à la streptomycine, antibiotique de référence pour le traitement de la peste, et l'autre une résistance à huit antibiotiques dont quatre recommandés par l'OMS. Dans les deux cas, le plasmide était capable de se transférer avec une fréquence élevée entre souches de *Y. pestis*. Ces plasmides seraient originaires d'entérobactéries largement répandues dans les produits alimentaires et leur acquisition par *Y. pestis* aurait eu lieu dans le tube digestif de la puce. Ceci fait redouter l'émergence et l'expansion de souches multirésistantes, ce qui constituerait une menace majeure en santé publique.

2.8 Yersinia pestis comme arme bactériologique

La première utilisation de la peste en temps qu'arme fut reportée en 1346 lors d'une attaque Tartare sur le port de Caffa (aujourd'hui Théodosie en Ukraine) alors contrôlé par les Génois (173). Des victimes de la peste dans le camp des agresseurs furent catapultées dans la ville, ce qui eut pour conséquence de déclencher une épidémie de peste au sein des troupes génoises. En 1710, les troupes russes en bataille contre des troupes suédoises envoyèrent également des victimes de la peste par-dessus les murs de la ville de Réval (aujourd'hui Tallinn en Estonie) (102).

Depuis le début du XX^{ème} siècle, il est probable que de nombreux pays aient conduit des recherches afin de produire des armes bactériologiques défensives et offensives impliquant *Y. pestis*. Il est par exemple connu que le Japon a mené des expériences avec de nombreux agents biologiques dans la région chinoise occupée de Mandchourie entre 1932 et la fin de la Seconde Guerre mondiale au sein de l'unité 731 de l'armée impériale (174, 175). Au moins 10 000 prisonniers de guerre furent utilisés par cette unité pour des expériences utilisant la peste et d'autres pathogènes et toxines. En octobre 1940, un avion militaire japonais aurait largué du riz et des puces infectés par *Y. pestis* au-dessus du village chinois de Chuhsien, provoquant une épidémie de peste bubonique. En 1942, au moins onze villes chinoises furent attaquées avec des agents biologiques au moyen de largages aériens ou furent contaminées par l'eau et de la nourriture.

A la suite de la seconde guerre mondiale, certains pays travaillèrent sur une méthode permettant d'utiliser *Y. pestis* sous forme d'aérosol afin de se passer des puces et de provoquer une peste pulmonaire primaire (176). En 1972, les armes biologiques furent bannies par une convention de

l'Organisation des Nations Unis (ONU). Cependant, cette convention, qui n'est toujours pas accompagnée de vérifications, n'a pas dissuadé certains pays de poursuivre ou d'entreprendre l'étude d'armes biologiques. Ainsi, bien que le programme américain d'armes biologiques fût clôturé en 1969 à la suite de scandales, l'URSS est suspectée d'avoir développé de nombreuses méthodes permettant de délivrer des souches de *Y. pestis* sauvages ou mutantes par aérosol. Depuis 1992, le programme soviétique est officiellement terminé mais des doutes subsistent sur son arrêt.

À présent, il semble que l'utilisation d'armes biologiques par des armées conventionnelles soit trop hasardeuse et imprédictible, autant pour les personnes visées que pour les utilisateurs. Mais aujourd'hui, il apparaît que ces mêmes agents biologiques pourraient être utilisés comme armes de choix par des organisations terroristes à cause du fort impact psychologique, et économique qu'elles auraient. Ainsi, depuis la contamination intentionnelle par *Salmonella enterica* sérovar Typhimurium de dix bars à salade dans l'Oregon en 1984 et la découverte d'un programme d'attentats bactériologiques par la secte Aum Shinrikyō au Japon en 1995, le risque d'utilisation de l'agent de la peste comme arme bactériologique par des terroristes apparaît beaucoup plus d'actualité (174). Toujours en 1995, Larry Wayne Harris, un microbiologiste de l'Ohio, fut arrêté après s'être procuré frauduleusement une souche de *Y. pestis* par simple courrier (176, 177).

De multiples facteurs font de *Y. pestis* un agent attractif pour le bioterrorisme : sa large distribution au sein de nombreuses zones fait qu'elle est accessible, elle est facilement cultivable et manipulable avec peu de moyens, le taux de mortalité engendré est très élevé, et de nombreuses connaissances et expertises ont déjà été générées quant à son utilisation en temps qu'arme. À la suite des attaques à l'aide d'enveloppes piégées au bacille de la maladie du charbon qui commencèrent après les attentats du 11 septembre 2001, l'opinion publique s'est sentie de plus en plus concernée par le risque d'une attaque bioterroriste et les recherches dans le domaine de la bio-défense se sont depuis fortement intensifiées. De plus, l'accroissement des connaissances et les progrès technologiques posent aujourd'hui de sérieux problèmes s'ils sont détournés à des fins malveillantes. Ces facteurs ont conduit les « Centers for Disease Control and Prevention » (CDC) aux États-Unis à classer *Y. pestis* dans la catégorie A du classement des agents potentiels du bioterrorisme. Créé dans un souci d'organisation et de prévention face à des attaques bioterroristes, ce classement a été effectué selon la virulence, le potentiel de diffusion et l'existence ou l'efficacité d'un traitement de ces agents potentiels du bioterrorisme. Cette catégorie A, qui est considérée comme la plus dangereuse, inclut également les agents biologiques responsables de la maladie du charbon (*Bacillus anthracis*), du botulisme (*Clostridium botulinum*), de la tularémie (*Francisella tularensis*), de la variole (*Variola major*) et de fièvres hémorragiques (*Filoviridae* et *Adenoviridae*) (178, 179).

II. L'ÉMERGENCE DES *YERSINIA* ET LES FACTEURS DE VIRULENCE

1. L'émergence des *Yersinia* pathogènes

Pour comprendre l'évolution des espèces pathogènes de *Yersinia*, de nombreuses études ont été réalisées. Lors d'études d'hybridation ADN/ADN réalisées en 1980, il est apparu que *Y. enterocolitica* est génétiquement plus éloignée des deux autres espèces pathogènes, tandis que les génomes de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* sont très proches. Les chromosomes des deux bactéries s'hybrident à 90%, et à 100% pour un plasmide commun appelé pYV/pCD1, faisant d'elles une seule espèce distincte (180). En 1998, un résultat similaire a été obtenu à la suite du séquençage des gènes codant l'ARN ribosomal 16S (181). Bien que les deux bactéries ne fassent génétiquement qu'une, une séparation taxonomique a toujours été maintenue du fait de la différence exceptionnelle de pathogénicité.

En 1999, une étude utilisant la MLST a indiqué que l'ancêtre des *Yersinia* pathogènes est apparu il y a 41 à 186 millions d'années et que la séparation entre *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*/*Y. pestis* s'est produite il y a un million d'années (182). L'étude a également permis d'identifier *Y. pestis* comme un clone de *Y. pseudotuberculosis* ayant émergé très récemment, depuis 1 500 à 20 000 ans, et possédant une variabilité génétique très limitée. Une étude de comparaison de gènes particuliers utilisant des puces à ADN a confirmé ces résultats en 2003 (183). En 2004 et 2010, l'étude des polymorphismes nucléotidiques (SNPs) et de génomes complets a permis la construction d'une première phylogénie (184, 185).

En 2001 a été publié le premier génome complet de *Y. pestis*, comprenant 4,65 millions de paires de bases et trois plasmides (186). Le premier génome complet de *Y. pseudotuberculosis* a été publié en 2003 et celui de *Y. enterocolitica* en 2006 (187, 188). Depuis, les génomes de nombreuses espèces du genre *Yersinia* ont été séquencés (189). Il apparaît aujourd'hui que contrairement à l'hypothèse d'un ancêtre commun à toutes les *Yersinia* pathogènes, l'évolution de chaque espèce se serait déroulée de façon indépendante tout en suivant un chemin parallèle dans l'acquisition des mêmes facteurs de virulence et la perte de certains métabolismes. Ceci aurait entraîné l'émergence parallèle et distincte de pathogènes humains proches et de plus en plus spécialisés à partir de bactéries non pathogènes et offre un nouveau paradigme dans l'étude de l'évolution des pathogènes (189).

Il est apparu qu'un des facteurs essentiels à la virulence des *Yersinia* est la présence d'un plasmide de virulence appelé pYV/pCD1. Sans cet élément, les *Yersinia* sont avirulentes. De plus, les souches les plus pathogènes possèdent un grand fragment de l'ADN chromosomique appelé Îlot de Haute Pathogénicité (HPI) qui est nécessaire à la bactérie pour lui permettre une dissémination

systémique. Cependant, ces deux éléments génétiques sont importants mais pas suffisants pour causer une infection car de nombreux autres facteurs participent à la virulence des *Yersinia*.

La comparaison de *Y. pestis* et de *Y. pseudotuberculosis* a également mis en évidence plusieurs divergences entre les espèces, notamment en ce qui concerne la capacité d'infecter les puces et de les utiliser comme vecteur (190). La modification du mode de transmission a été une évolution primordiale dans la récente histoire de *Y. pestis* (125). Actuellement, la comparaison des deux génomes bactériens est utilisée afin d'identifier des régions essentielles à la pathogénicité du bacille de la peste.

2. Le plasmide pYV

L'acquisition du plasmide pYV a été une étape importante dans l'évolution des *Yersinia* et sa perte s'accompagne d'une diminution très forte de la virulence. En effet, les *Y. enterocolitica* non pathogènes du biotype 1A ne possèdent pas ce plasmide. Chez *Y. pseudotuberculosis*, sa présence classe les souches comme pathogènes.

Cependant, même si les séquences des gènes du plasmide sont hautement conservées entre les espèces, des réarrangements intraplasmidiques sont intervenus au cours de l'évolution des *Yersinia* entéropathogènes (191). En effet, certains gènes comme *yopM* ou *yadA* n'ont pas la même orientation chez *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*. Toutes les souches pathogènes de *Y. pestis* possèdent le plasmide pYV qui est cependant légèrement différent par la présence des séquences d'insertions et de transposons.

1.1 Le système de sécrétion de type III

Le plasmide pYV code un système de sécrétion de type III appelé injectisome (figure 9). Il est composé des protéines Ysc (Yop secretion), de la protéine LcrV qui forment une « aiguille » à la surface de la bactérie, et des protéines de translocation Yops (*Yersinia* outer proteins, appelées ainsi car elles ont été initialement trouvées associées à la membrane externe) (192).

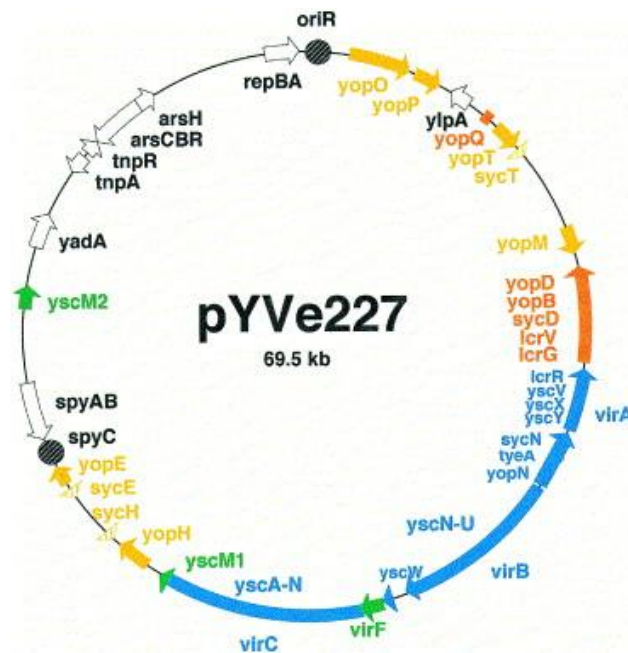


Figure 9 : Le plasmide pYV de *Y. enterocolitica* W22703. Les gènes colorés en bleu codent les protéines Ysc, les gènes en orange codent les protéines utiles à la sécrétion, les gènes en orange codent les protéines de translocation, les gènes en orange codent les protéines effectrices et leurs chaperonnes, et les gènes en vert sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes. D'après (193).

Les Yops transiteraient dans la cellule cible grâce au système de sécrétion de type III composé des protéines Ysc et de LcrV (figure 10). Cependant, le modèle de translocation des Yops par un système d'injectisome a été remis en question récemment et s'apparenterait plus au mécanisme de translocation des toxines AB avec la présence d'une protéine de translocation et une protéine effectrice (figure 11) (194).

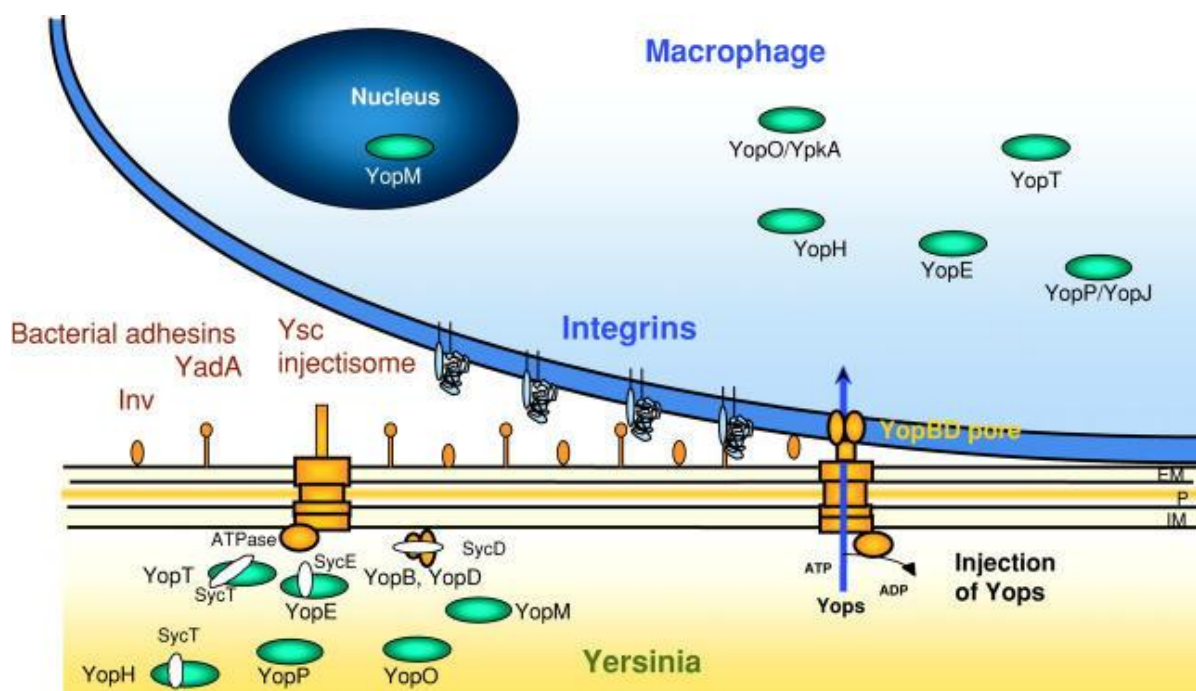


Figure 10 : Modèle proposé pour la sécrétion des Yops par translocation de l'injectisome à la cellule cible. D'après (195).

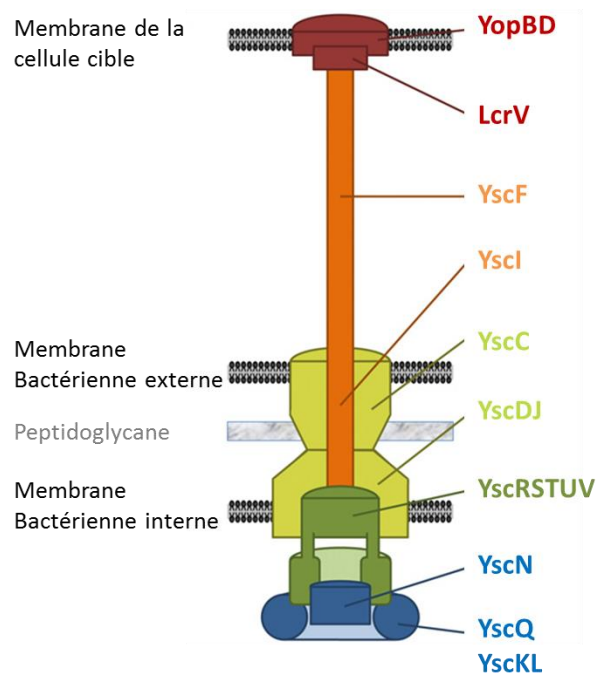


Figure 12 : Représentation schématique de l'injectisome du système de sécrétion de type III. D'après (192).

Les Yops sont des protéines effectrices intracellulaires qui agissent sur de nombreux paramètres cellulaires une fois entrées dans la cellule cible (200, 201). Elles induisent un réarrangement du cytosquelette d'actine afin de permettre à la bactérie d'échapper à la phagocytose. Elles interfèrent avec la signalisation cellulaire et inhibent la libération de $\text{TNF-}\alpha$. Elles inhibent également la réponse immunitaire innée en induisant l'apoptose des macrophages, cellules dendritiques, granulocytes et neutrophiles. La bactérie peut ainsi se maintenir dans le milieu extracellulaire (202). Six protéines effectrices ont été identifiées : YopE, YopH, YopJ/YopP, YopM, YopO/YpkA, et YopT (203). Pour que ces protéines effectrices soient délivrées dans la cellule cible, deux protéines de translocation YopB et YopD, ainsi que LcrV sont nécessaires (204). D'autres Yops ont des fonctions différentes. La protéine YopR est impliquée dans la sécrétion de YscF qui forme l'aiguille, alors que YopK/YopQ et YopN sont impliquées dans la régulation de la translocation des autres Yops (205, 206).

1.2 D'autres gènes du plasmide pYV

Le plasmide pYV contient le gène *yadA* qui code une adhésine produite à 37°C nommée YadA et qui forme des structures fibrillaires à la surface des *Yersinia* entéropathogènes. Cependant, il existe des différences entre YadA de *Y. enterocolitica* (YeYadA) et YadA de *Y. pseudotuberculosis* (YpYadA) (207). Leurs poids moléculaires sont différents et elles se lient à des composants distincts de la matrice extracellulaire eucaryote (208). Ainsi, YeYadA se lie au collagène, à la fibronectine et la laminine alors que YpYadA se lie seulement à la fibronectine. De plus, si toutes deux permettent l'adhésion à différentes cellules comme les cellules épithéliales, les neutrophiles et les macrophages

par l'intermédiaire des intégrines de la famille $\beta 1$, YpYadA permet l'invasion de ces cellules contrairement à YeYadA (209). Pour des raisons inconnues, elle semble jouer un rôle majeur dans la virulence de *Y. enterocolitica*, mais pas dans celle de *Y. pseudotuberculosis* (210). YadA joue également un rôle dans le blocage de l'immunité innée de l'hôte en agissant sur le système du complément. Elle est aussi nécessaire à l'auto-agglutination des bactéries et joue un rôle dans le positionnement de l'injectisome qui permet à la bactérie de délivrer les Yops (211). Cependant chez *Y. pestis*, *yadA* est un pseudogène qui code une protéine tronquée dont le rôle n'est pas défini (212).

Un gène appelé *ylpA* est également présent sur le plasmide. Il code une lipoprotéine qui ne semble pas avoir de rôle dans la virulence des *Yersinia* (213). Chez *Y. pestis*, le gène est présent mais possède une mutation qui crée un décalage du cadre de lecture et entraîne un arrêt prématuré de la transcription (214).

3. L'Îlot de Haute Pathogénicité

L'Îlot de Haute Pathogénicité (HPI) est un facteur essentiel de la virulence des *Yersinia* pathogènes (215, 216). C'est un grand fragment de l'ADN chromosomique qui code principalement les gènes impliqués dans le système de capture du fer par l'intermédiaire d'un sidérophore appelé yersiniabactine. Chez *Y. enterocolitica*, l'HPI n'est pas présent chez les souches non pathogènes du biotype 1A et les souches faiblement pathogènes des biotypes 2 à 5 mais est présent chez les souches très pathogènes du biotype 1B. Chez *Y. pseudotuberculosis*, l'HPI n'est pas retrouvé chez toutes les souches, seulement chez quelques-unes des sérotypes I et III (216, 217). Chez *Y. pseudotuberculosis*, l'HPI est capable d'être transmis horizontalement entre deux bactéries (218). Il a été suggéré que l'acquisition de l'HPI par *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* s'est effectuée de façon indépendante après leur divergence, faisant de son acquisition une étape essentielle dans l'émergence de souches hautement pathogènes (219). L'HPI est divisé en trois parties : le locus yersiniabactine, la région variable gauche et les extrémités. Sa taille est différente selon l'espèce de *Yersinia* et cette différence se situe dans la partie variable gauche. Il est cependant très conservé entre *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*.

La yersiniabactine capture le fer fixé sur des protéines eucaryotes avec une très haute affinité puis le transporte vers le cytoplasme des *Yersinia*. La capture du fer joue un rôle important dans la croissance de la bactérie et est essentielle lors de l'infection (220). De plus, L'HPI est nécessaire à la dissémination systémique des *Yersinia* pathogènes. Sans celui-ci, *Y. pestis* ne gagnerait pas la circulation sanguine et ne pourrait alors pas être ingurgitée par les puces.

4. Les loci *hms* et *gmhA*

Avant la divergence entre *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis*, l'ancêtre commun des deux bactéries a acquis le locus *hms* présent sur un fragment instable appelé locus *pgm*. Ce locus code un complexe protéique qui permet à la bactérie d'accumuler le fer et l'hémine à sa surface. Ce locus *hms* joue un rôle essentiel dans la transmission de *Y. pestis* en permettant le blocage du proventricule de la puce par l'adhésion de la bactérie aux cuticules du proventricule et la formation d'un biofilm protecteur (126).

Un autre gène, *gmhA*, est essentiel aux deux pathogènes pour la formation d'un biofilm (221).

L'acquisition verticale de ces séquences génomiques a permis à *Y. pestis* d'être transmise par les puces et d'augmenter sa virulence. Mais bien que l'identité nucléotidique de ces gènes soit proche de 100% entre les deux bactéries, *Y. pseudotuberculosis* est incapable de bloquer les puces (222). Ceci suggère la présence d'autres facteurs nécessaires au blocage ou l'inactivation de plusieurs gènes (223).

5. Les adhésines chromosomiques

Différentes adhésines sont présentes à la surface des *Yersinia* pathogènes et sont nécessaires à l'expression du pouvoir pathogène. Cependant, leur répartition au sein des différentes espèces ainsi que leurs rôles peuvent différer (207).

L'adhésine YadA codée par le plasmide pYV a précédemment été décrite.

Le gène *inv*, présent chez *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* code une protéine invasive localisée sur la membrane externe. Elle se lie aux molécules de laminine et de fibronectine de la matrice extracellulaire et ses récepteurs cellulaires sont des intégrines de la famille $\beta 1$ présentes sur de nombreuses cellules de mammifères et notamment à la surface apicale des cellules M (54). Elles sont impliquées dans de nombreuses fonctions comme l'adhésion cellulaire, l'invasion des cellules épithéliales ou l'induction de la production de cytokines (224, 225).

Le gène chromosomique *ail* (attachment invasion locus) confère aux *Yersinia* la capacité d'adhérer aux cellules épithéliales et permet ainsi à la bactérie de délivrer les Yops (226). Elle se lie à différents composants de la matrice extracellulaire tels que la laminine, la fibronectine et les héparanes sulfates (227). Chez *Y. pestis*, cette protéine permet également d'inhiber l'action bactéricide du complément lors de la réponse immunitaire innée de l'hôte (228). Cependant de par sa petite taille, la protéine Ail est masquée par l'antigène O du LPS de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* et ne pourrait donc plus jouer de rôle actif dans la résistance au sérum (207).

Chez *Y. pestis* le gène chromosomique *psaA* code l'antigène pH6 qui joue le rôle d'adhésine mais protège surtout la bactérie contre la phagocytose réalisée par les macrophages (226, 229). Elle jouerait également un rôle dans le positionnement de l'injectisome qui permet à la bactérie de délivrer

les Yops (226). Chez *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*, le gène *myf* (mucoid *Yersinia* factor) produit une protéine similaire (230). Cependant, son rôle d'adhésine et de protection n'est pas clair (207).

Le gène *yapE* code pour l'autotransporteur YapE des *Yersinia* qui a des propriétés adhésives à l'encontre des cellules eucaryotes et qui serait important chez *Y. pestis* pour la colonisation du système lymphatique et des organes (231).

Il est intéressant de noter que les gènes *inv*, *ail* et *myf* ne sont pas présents chez le biotype 1A non pathogène de *Y. enterocolitica*.

6. L'acquisition horizontale de gènes chez *Yersinia pestis*

L'acquisition de nouveaux éléments génétiques par transferts horizontaux a participé à l'émergence de *Y. pestis*, un clone très différent des entéropathogènes. Deux événements importants sont l'acquisition de deux plasmides : pFra et pPla.

Le plasmide pFra (appelé également pMT) aurait été acquis lors d'un transfert entre une bactérie de l'espèce *Salmonella* vers *Y. pseudotuberculosis* et/ou *Y. pestis* (232). Ce transfert se serait produit chez un hôte infecté, puce ou mammifère, et plus particulièrement dans le sang. Sur ce plasmide, le locus *caf* code la protéine Fraction 1 (F1) qui forme à 37°C une capsule fibrillaire autour de la bactérie (233). Celle-ci permet de la protéger contre la phagocytose et certains agents antibactériens (234, 235). Sur le plasmide pFra, le gène *ymt* code une phospholipase D originellement identifiée comme une toxine murine. La phospholipase D permet la survie de *Y. pestis* dans l'intestin de la puce et sa colonisation (236). Cependant le plasmide pFra n'aurait pas de rôle dans la virulence de *Y. pestis* (237).

Le plasmide pPla (appelé également pPCP1 ou pPst) code entre autres une protéase de surface appelée Pla (plasminogen activator) qui est un activateur du plasminogène (238). Pla possède une activité coagulase prédominante à 26°C mais ne semble pas intervenir dans le blocage de la puce (239). Son activité fibrinolytique est majoritaire à 37°C et permet d'activer le plasminogène en plasmine, favorisant ainsi la dissémination de la bactérie à partir du site d'injection vers les tissus lymphatiques (240). L'activité fibrinolytique va aussi influencer la coagulation, la fibrinolyse et l'inflammation de l'hôte (207). La protéine Pla est également capable de dégrader le complément et d'adhérer à la matrice extracellulaire (241). Elle jouerait également un rôle dans le positionnement de l'injectisome qui permet à la bactérie de délivrer les Yops, remplaçant le rôle des adhésines Inv et YadA non fonctionnelles chez *Y. pestis* (226). Le plasmide pPla serait essentiel à la virulence de *Y. pestis* (161, 242). Cependant, certaines souches ne possédant pas ce plasmide sont toujours virulentes.

Y. pestis a également acquis neuf régions chromosomiques dont une codant un phage filamenteux qui permet une colonisation plus efficace de l'hôte et une augmentation de la pathogénicité (243, 244). Les adhésines YadB et YadC spécifiques de *Y. pestis* auraient également un rôle dans le pouvoir invasif mais seulement un rôle très modéré dans la virulence (245).

7. Les gènes inactivés chez *Yersinia pestis*

Y. pestis a également perdu de nombreux gènes chromosomiques par délétion ou inactivation (187). Une grande différence génétique entre *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* est la présence de nombreuses séquences d'insertion chez *Y. pestis* qui seraient à l'origine d'une plasticité génomique plus grande et donc une facilité d'adaptation à de nouvelles niches écologiques. Aussi, dans le génome de *Y. pestis*, la perte et l'inactivation de matériel génétique semblent aussi importantes que l'acquisition de nouveaux gènes. Il apparaît que 13% des gènes de *Y. pseudotuberculosis* ne sont plus fonctionnels chez *Y. pestis*. Il est probable que beaucoup d'entre eux n'étaient plus nécessaires à *Y. pestis* dans son nouveau cycle de vie, entraînant une évolution réductive. Cependant, certains de ces gènes pourraient avoir été éliminés parce qu'ils avaient un effet délétère à l'expression du pouvoir pathogène. Ce concept de « trou noir » a été décrit par Anthony Maurelli en 1998 chez l'espèce *Shigella* dont l'émergence à partir de son ancêtre non pathogène *Escherichia coli* s'est accompagnée de pertes de gènes ayant augmenté sa virulence (246).

De nombreux gènes importants pour la virulence des *Yersinia* entéropathogènes sont inactivés, notamment des gènes requis pour l'entéropathogénie et la transmission oro-fécale. C'est le cas des gènes *inv* et *yadA* (247). Le gène *ureD* qui code une uréase est inactivé car la production d'uréase, qui permet de survivre à des pH très acides comme ceux rencontrés dans l'estomac, ne semble plus nécessaire à *Y. pestis* (248). La mobilité est un facteur de virulence pour les *Yersinia* entéropathogènes. Mais chez *Y. pestis*, de nombreuses mutations sont accumulées dans certaines voies de biosynthèse, et notamment dans la formation du LPS et des flagelles (249). De nombreux autres exemples d'inactivation existent pour des gènes impliqués dans des fonctions physiologiques (250). De plus, l'analyse *in silico* des génomes de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* a mis en évidence la perte de dix régions génomiques chez le bacille de la peste lors de son émergence. Pourtant, lorsque certaines de ces régions sont inactivées, un effet délétère pour la survie, la virulence et la croissance de *Y. pseudotuberculosis* est observé (251).

8. L'évolution du pouvoir pathogène de *Yersinia pestis*

Il semble assez probable que *Y. pestis* ait émergé d'une souche hébergeant le plasmide pYV et l'HPI. Cette souche était probablement une *Y. pseudotuberculosis* qui avait déjà la capacité de former des biofilms. L'ancêtre de *Y. pestis* aurait ensuite acquis le plasmide pFra par conjugaison, peut-être à partir d'une *Salmonelle*. L'acquisition de ce plasmide, du gène *gmhA* et du locus chromosomique *hms* ont permis à la bactérie de coloniser et de bloquer la puce. Par la suite, l'acquisition du plasmide pPla et la présence de l'HPI a permis au bacille de disséminer efficacement du site de piqûre vers la circulation sanguine et de contribuer à augmenter sa transmissibilité. Le plasmide pPla a également participé à l'augmentation du pouvoir pathogène, tout comme les différentes modifications chromosomiques apparues entre *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* (250).

Malgré la connaissance de nombreux facteurs de virulence, il reste encore beaucoup de questions à propos de ce pouvoir pathogène exceptionnel. Une des réponses se trouve sans doute dans les différences d'expression des gènes communs observées lors de l'étude comparative des transcriptomes de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* (252).

III. LES ANTICORPS CONTRE LES *YERSINIA*

1. Les anticorps contre *Yersinia pestis*

1.1. La vaccination

La première vaccination d'animaux contre *Y. pestis* fut réalisée en 1895 par les Pasteuriens Alexandre Yersin, Albert Calmette et Amédée Borrel en inactivant préalablement le bacille par la chaleur (253). Mais le procédé le plus communément utilisé fut développé par Waldemar Haffkine en 1896 (254). Le bacille était cultivé dans un milieu contenant du beurre clarifié, puis l'émulsion laiteuse obtenue était inactivée par la chaleur. L'efficacité de ce vaccin fut démontrée chez l'humain durant une épidémie de peste à Bombay en 1897.

Historiquement, deux types de vaccins furent utilisés pour protéger de la peste : deux vaccins réalisés à partir d'une souche inactivée et un vaccin vivant atténué appelé EV76 (255).

Le vaccin EV76 fut le premier à être largement utilisé depuis le début du XX^{ème} siècle. Développé à Madagascar entre 1926 et 1932 par Georges Girard et Jean-Marie Robic, il utilise une souche atténuée nommée EV76 dérivée d'une *Y. pestis* virulente (256). Employé en dose unique, il conférait une protection contre les formes bubonique et pulmonaire. Cependant, la souche EV76 n'est pas totalement avirulente et de nombreux incidents parfois mortels furent reportés. De plus, le fait

d'utiliser une souche vivante expose aux problèmes découlant de l'instabilité génétique de *Y. pestis*. Particulièrement utilisé en URSS, en Chine et dans les colonies françaises et belges, ce vaccin n'est aujourd'hui plus utilisé à grande échelle.

Le vaccin UPS réalisé avec une souche inactivée au formaldéhyde fut développé par les États-Unis dans les années 40 afin de protéger en premier lieu le personnel militaire (255). Son administration se déroulait en trois injections intramusculaires. De nombreux effets secondaires pouvaient survenir lors de son utilisation. Aucun essai clinique ne fut réalisé avec ce vaccin et la preuve de son efficacité fut seulement basée sur le nombre de cas de peste chez les militaires américains lors de la guerre du Viêt Nam. De plus, il est apparu que ce vaccin ne conférait qu'une protection courte et limitée contre la forme bubonique et aucune protection contre la forme pulmonaire. Utilisé par les occidentaux, il n'était dispensé qu'à des personnes pouvant avoir des contacts avec des souches virulentes et le personnel militaire travaillant dans des zones où la peste était endémique. Il n'est plus disponible depuis 1999 (257). Un autre vaccin appelé CSL réalisé avec une souche inactivée à la chaleur fut développé en Australie (258).

A ce jour, il n'existe pas de vaccins efficaces et bien tolérés contre la peste. De nombreuses équipes scientifiques travaillent sur cette problématique et laissent entrevoir de multiples possibilités pour l'obtention d'un futur vaccin efficace. Certaines équipes travaillent sur des vaccins à « sous-unité » utilisant comme antigènes des protéines recombinantes de *Y. pestis* qui ont prouvé un effet immunogène et protecteur (capsule F1, LcrV, YscF, Pla, LPS, Yops...) (259). Un vaccin développé par l'armée américaine, appelé rF1V, est aujourd'hui en phase II d'un essai clinique aux États-Unis et protégerait de la forme bubonique et pulmonaire (260). D'autres équipes développent des vaccins vivants atténués, utilisant toujours différentes souches de *Y. pestis* mais aussi des souches de *Salmonella* exprimant des protéines immunogènes de *Y. pestis* ayant pour avantage de pouvoir être délivré oralement (261). Une autre stratégie novatrice utilise une souche de *Y. pseudotuberculosis* modifiée. Génétiquement très proche de *Y. pestis*, cette vaccination confère une très bonne protection contre les formes bubonique et pulmonaire chez la souris (262).

1.2. L'immunothérapie

Dès la découverte du bacille de la peste, les premières approches thérapeutiques furent développées par les Pasteuriens Alexandre Yersin, Albert Calmette et Amédée Borrel. En inoculant le bacille inactivé à la chaleur à des lapins, des cobayes et des chevaux, ils réalisèrent différents séra (253). Ces séra anti-pestueux furent utilisés sur différents animaux infectés et les résultats obtenus furent encourageants. En 1896, un sérum équin, qui avait prouvé son efficacité pour traiter des souris infectées, fut utilisé chez l'homme. Cette première expérience de sérothérapie menée en Chine par Alexandre Yersin permit de sauver 24 malades sur 26 traités (118).

Par la suite, d'autres expériences utilisant le sérum anti-pestueux furent couronnées de plus ou moins de succès, les difficultés venant de l'hétérogénéité rencontrée d'un lot de sérum à un autre (115). De plus, l'utilisation des antibiotiques dans les années 50 mit un frein aux recherches sur la sérothérapie contre le bacille de la peste puis les supplanta. Cependant, de nombreuses protéines de *Y. pestis* furent décrites pour leur fort pouvoir immunogène. C'est le cas de l'antigène F1, dont le gène est présent sur le plasmide pFra, qui fut étudié avec intérêt dès 1948 (263, 264). En effet, les sérums polyclonaux contenant des anticorps F1 protégeaient des souris de l'infection à *Y. pestis*. En 1997, une équipe produisit pour la première fois trois anticorps monoclonaux murins contre l'antigène F1 (265). L'étude démontra avec un des trois anticorps produits et appelé F1-04-A-G1, que l'immunité humorale était suffisante pour protéger les souris lors d'une infection à *Y. pestis*, validant l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre *Y. pestis*. F1 n'est pas un antigène idéal à cibler pour la réalisation d'anticorps thérapeutiques car il existe certaines souches de *Y. pestis* dépourvues de cette protéine F1 mais toujours virulentes.

Dès 1958, Burrows et Bacon suggérèrent également un pouvoir immunogène pour l'antigène V (LcrV), dont le gène est présent sur le plasmide pYV (266). En effet, des études réalisées par la suite ont montré que du sérum polyclonal contenant des anticorps dirigés contre l'antigène V octroyait une protection contre *Y. pestis* (267). En 1997, une équipe produisit seize anticorps monoclonaux murins contre l'antigène V (268). Parmi ceux-ci, l'anticorps appelé 7.3 donné en prophylaxie protège complètement des souris dans un modèle d'infection de peste bubonique *in vivo* (tableau 3).

En 2003, ces deux anticorps monoclonaux murins contre LcrV et F1 furent testés chez des souris avec un modèle de peste bubonique et de peste pulmonaire (269). En plus d'avoir un effet prophylactique, les deux anticorps co-administrés jusqu'à 48 h post-infection ont un effet thérapeutique (tableau 3). Administré seul, l'anticorps 7.3 anti-LcrV a également un effet prophylactique et thérapeutique jusqu'à 24 h post-infection (100% de survie en prophylactique 4 h avant l'infection et 80% de survie si administration à 24 h post-infection, dans le tableau 3). Lorsqu'ils sont administrés sous forme d'aérosol dans un modèle murin de peste pulmonaire, ces anticorps possèdent également un effet protecteur (75% de survie si administration 2 h post-infection, dans le tableau 3) (270).

Référence	(269)	(270)						(271)	
Nom de l'anticorps	7.3 (anti-LcrV)	7.3 + F1-04 (anti-F1)					7.3		7.3 + F1-04
Moment d'administration	- 24 h avant	+ 4 h			+ 48 h		- 4 h	+ 24 h	+ 2 h
Dose	350 µg	35 µg + 100 µg					35 µg		77,5 µg + 77,5 µg
Voie d'administration anticorps	i.p.	i.p.						i.n.	
Nombre <i>Y. pestis</i> (cfu)	10 cfu	50	500	5000	50000	91	88		2700
x DL ₅₀	10	50	500	5000	50000	91	88		27
Voie d'administration <i>Y. pestis</i>	s.c.	s.c.					i.n.		i.n.
Souris vivantes/Souris testées	12/12	6/6	6/6	5/6	6/6	4/5	10/10	8/10	9/12

Tableau 3 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (268-270). i.p. : voie intra-péritonéale ; i.n. : voie intra-nasale ; s.c. : voie sous-cutanée.

En 2009, un autre laboratoire produisit sept anticorps monoclonaux murins contre LcrV. Un de ces anticorps, appelé BA5, est capable de protéger les souris de la peste pulmonaire s'il est administré 1 h avant l'infection (tableau 4) (271). Toujours en 2009, une autre équipe produisit onze nouveaux anticorps monoclonaux murins contre LcrV. L'un d'eux, appelé 2C12.4, présente un effet protecteur dans un modèle de peste pulmonaire (tableau 4) (272). Un adénovirus modifié pouvant produire cet anticorps après son injection a également un effet thérapeutique lorsqu'il est administré 4 jours avant l'infection (tableau 4).

Référence	(272)	(273)
Nom de l'anticorps	BA5 (anti-LcrV)	2C12.4 (anti-LcrV) + adénovirus
Moment d'administration	- 1 h	- 2 h - 96 h
Dose	400 µg	500 µg
Voie d'administration anticorps	i.p.	i.p.
Nombre <i>Y. pestis</i> (cfu)	6000	20000
x DL ₅₀	20	363
Voie d'administration <i>Y. pestis</i>	i.n.	i.n.
Souris vivantes/Souris testées	9/10	5/7 6/7

Tableau 4 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (271, 272). i.p. : voie intra-péritonéale ; i.n. : voie intra-nasale.

En 2010, des anticorps monoclonaux recombinants humains furent obtenus par la technique du phage display (273). Dans un modèle de peste bubonique chez la souris, un anticorps dirigé contre F1 et deux anticorps dirigés contre LcrV et utilisés individuellement ou en combinaison et administré avant l'infection n'ont pas d'effet protecteur *in vivo*. Un effet de synergie est seulement observé lorsque les trois anticorps sont utilisés en combinaison avant l'infection (83% de survie, dans le tableau 5). L'anticorps contre F1 possède cependant un effet thérapeutique lorsqu'il est administré après l'infection à *Y. pestis* (100% de survie si administration à 48 h post-infection mais seulement 33% de survie si administration à 24 h post-infection, dans le tableau 5).

Référence	(274)						
Nom de l'anticorps	m252 (anti-F1)	m253 (anti-LcrV)	m254 (Anti LcrV)	Mélange	m252		
Moment d'administration	- 24 h				+ 24 h	+ 48 h	- 24 h / + 120 h
Dose	500 µg				500 µg		
Voie d'administration anticorps	i.p.				i.p.		
Nombre <i>Y. pestis</i> (cfu)	50 - 80				50 - 80		
x DL ₅₀	25 - 40				25 - 40		
Voie d'administration <i>Y. pestis</i>	s.c.				s.c.		
Souris vivantes/Souris testées	1/6	0/6	0/6	5/6	2/6	6/6	5/6

Tableau 5 : Récapitulatif des résultats obtenus avec les anticorps (273). i.p. : voie intra-péritonéale : voie sous-cutanée.

Aujourd'hui, l'utilisation d'anticorps ciblant le système de sécrétion de type III semble une bonne stratégie pour bloquer le processus infectieux de *Y. pestis*. Cependant la production et la caractérisation d'anticorps monoclonaux murins ou humains anti-LcrV n'a pas donné lieu à des développements pour la médecine humaine. Concernant la protéine YscF dont le gène est présent sur

le plasmide pYV, il apparaît que celle-ci a un potentiel immunogène fort (274, 275), mais aucun anticorps contre cette protéine de *Y. pestis* n'a encore été évalué.

1.3. Le mécanisme d'action des anticorps anti-injectisome

Une question intéressante est de savoir quel était le mode d'action des anticorps dirigés contre LcrV sur *Y. pestis*. Etant donné les différentes fonctions exercées par LcrV, plusieurs mécanismes peuvent être envisagés. Les anticorps contre LcrV pourraient permettre l'opsonisation de la bactérie et favoriser sa phagocytose. Ils pourraient bloquer le système de sécrétion de type III (par blocage de l'insertion dans la membrane ou par blocage de la sécrétion) et donc la distribution des Yops. Ils pourraient neutraliser l'activité anti-inflammatoire de LcrV. Enfin, ils seraient en mesure de neutraliser l'effet chimiotactique de LcrV sur les cellules de l'immunité.

L'anticorps 7.3 réalisé en 1997 est capable *in vitro* de bloquer la distribution des Yops dans le cytosol de la cellule cible (276). Il est également capable de protéger des macrophages murins de la mort cellulaire induite par *Y. pestis* et inverse l'inhibition de la phagocytose, allant jusqu'à l'induire (277). Cependant, *Y. pestis* est capable plus tardivement de contourner l'action de cet anticorps (278). Il semblerait au final que l'anticorps monoclonal 7.3 neutralise directement le système de sécrétion de type III, empêchant ainsi la distribution des Yops (279).

L'anticorps BA5 réalisé en 2009 est également capable *in vitro* de bloquer la distribution des Yops par le système de sécrétion de type III et de permettre l'opsonisation de la bactérie, induisant ainsi sa phagocytose (280).

Des études effectuées avec des anticorps polyclonaux de lapin suggèrent des mécanismes légèrement différents. Il apparaît que ces anticorps n'auraient pas d'action sur l'activité anti-inflammatoire de LcrV influencée par IL-10 (281). Il semblerait au final que l'activité prédominante de ces anticorps serait de favoriser la phagocytose par opsonisation (271). L'inhibition de la distribution des Yops serait une conséquence de la phagocytose et non pas due à un blocage direct du système de sécrétion de type III (282).

1.4. La nécessité de développer la sérothérapie contre *Yersinia pestis*

Bien qu'aujourd'hui les anticorps aient prouvé leur efficacité à traiter et prévenir certaines maladies infectieuses, il n'existe toujours pas de thérapie contre *Y. pestis* les utilisant (283, 284). Pourtant, face au risque de bioterrorisme et à l'émergence d'antibiorésistances il est important de développer de nouvelles stratégies contre *Y. pestis*.

L'utilisation malveillante du bacille de la peste est une possibilité qu'il ne faut pas négliger. En plus de sa très haute pathogénicité et forte transmissibilité (pour la peste pulmonaire), ses impacts psychologiques et économiques sur les populations en font une arme redoutable. Ainsi à titre de

comparaison, l'épidémie de peste bubonique et pulmonaire de 1994 en Inde avait créé un vent de panique et avait très fortement désorganisé l'économie du pays avec une perte estimée de 3 à 4 milliards de dollars en moins de trois semaines (285).

L'émergence d'antibiorésistances est un problème majeur de santé publique. Pour *Y. pestis*, l'existence de plasmides de résistance facilement transférables est devenue un véritable sujet de préoccupation (172). Ce problème est d'autant plus préoccupant si l'on considère que des souches peuvent aisément être sélectionnées ou modifiées en laboratoire pour être résistantes aux antibiotiques en cas d'utilisation malveillante (284).

Enfin, il n'existe toujours pas de vaccination efficace et utilisable à grande échelle.

Par conséquent, on ne peut que relever le potentiel qu'offrirait l'utilisation d'anticorps thérapeutiques pour répondre à ces différents risques. Les anticorps pourraient compléter voire même remplacer l'antibiothérapie actuellement utilisée. Ils peuvent également être employés en prophylaxie apportant ainsi une protection immédiate à toute personne à risque contrairement à la vaccination qui nécessite un délai (temps de la réponse immunitaire) pour être effective et requiert des rappels pour son maintien. De plus, lors d'expositions à de fortes doses comme cela pourrait être le cas lors d'un acte terroriste, les anticorps ont l'avantage de pouvoir être administrés en grande quantité et de fournir une meilleure protection immédiate que la vaccination.

2. Les anticorps contre *Yersinia* entéropathogènes

2.1. L'utilisation d'anticorps pour la détection des *Yersinia* entéropathogènes

De nombreuses méthodes immunométriques pour la détection des anticorps circulants contre les *Yersinia* entéropathogènes existent et sont commercialisées pour permettre un diagnostic sérologique. Au contraire, très peu sont disponibles pour la détection directe des bactéries.

Il existe deux tests immunométriques basés sur l'agglutination pour la détection directe de *Y. enterocolitica*. La firme allemande Progen commercialise un test utilisant des anticorps monoclonaux murins et réalisable en une minute pour la détection des sérotypes O:3 et O:9 (286). Cependant, ce test requiert d'avoir des colonies déjà isolées. La firme finlandaise Ani Biotech Oy avait commercialisé un test similaire pour la détection des sérotypes O:3, O:6 et O:8 en trente secondes sur une carte servant de support à des billes de latex entourées d'anticorps. Ce test qui requerrait également des colonies isolées n'est plus commercialisé.

Des tests ELISA pour la détection directe de *Y. enterocolitica* ont également été développés en 1989 mais jamais commercialisés. Un ELISA utilisant des anticorps polyclonaux de lapins fut capable de détecter de nombreux biotypes et sérotypes de *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* à partir de colonies isolées (287). Cependant, il apparut que cet ELISA ne permettait que la détection des

Yersinia pathogènes qui possédaient le plasmide de virulence pYV et seulement lorsque elles étaient cultivées à 37°C. Hors, il n'est pas rare que des *Yersinia* initialement pathogènes perdent le plasmide pYV lorsqu'elles sont cultivées dans des conditions de type laboratoire. En 2007, un ELISA indirect par compétition utilisant des anticorps polyclonaux de lapins permis la détection de différents sérotypes de *Y. enterocolitica* (288). Cependant, la limite de détection de cet ELISA paraît élevée. De plus, aucun de ces deux ELISA n'a été testé avec des échantillons complexes comparables aux fèces dans lesquels sont recherchés les *Yersinia* entéropathogènes. Plus récemment en 2012, une équipe réalisa des anticorps monoclonaux murins contre la protéine de surface Ail, spécifique des *Yersinia* entéropathogènes (289). Testés en format ELISA notamment, il semblerait que ces anticorps pourraient être utilisés pour la détection de *Y. enterocolitica*. Cependant, certaines souches non pathogènes produisent également la protéine Ail.

Développé à partir dans les années 1950 et popularisé par les tests de grossesse, le format de tests immuno-chromatographiques de type tests bandelettes concentre de nombreux avantages (290). Le principal reste sa simplicité d'utilisation. De plus, il semble parfaitement convenir pour la détection de bactéries. En effet, ce format bandelette est déjà utilisé avec succès dans la détection de *Y. pestis*, notamment à Madagascar (166, 169). La détection s'effectue très rapidement en moins de 15 minutes et directement sur des échantillons biologiques (bubon, crachat, biopsie *post mortem* d'organes). Ce format bandelette a également été testé et a prouvé son efficacité en condition réelle avec des fèces contaminés pour la détection de *Vibrio cholerae* ou d'entérobactéries du genre *Shigella* (291-293). Sa simplicité d'utilisation a permis son exploitation dans les conditions précaires rencontrées dans certains pays tels que le Viêt Nam ou la République démocratique du Congo. A travers ces exemples, l'utilisation de tests immuno-chromatographiques de type bandelettes semble très intéressante pour la détection des *Yersinia* entéropathogènes car à l'heure actuelle, il n'existe toujours pas de tests de détection de l'ensemble des *Yersinia* entéropathogènes qui soient rapides, spécifiques, sensibles et faciles à utiliser.

2.2. La nécessité de développer la détection des *Yersinia* entéropathogènes

Les infections à *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* paraissent être un véritable problème de santé publique fortement sous-estimé dans certains pays froids et tempérés dont la France. En médecine humaine, leur recherche dans les coprocultures est peu spécifique, longue et onéreuse. De plus, face à une détection qui s'avère difficile, leur recherche n'est pas systématiquement demandée par le personnel médical. Cet état de fait conduit certainement à une sous-estimation de l'incidence de ces infections, la prescription de traitements antibiotiques non adaptés et la réalisation d'appendicectomies non nécessaires. En médecine vétérinaire, l'importance et la forte incidence de ces infections ne font aucun doute face aux préjudices, notamment économiques, qu'elles engendrent. De plus, aucune procédure unique n'est disponible pour détecter toutes les souches entéropathogènes.

Des méthodes de détection directes, rapides, spécifiques, sensibles et faciles à utiliser seraient de bons outils en médecine humaine pour améliorer le diagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes, pour entreprendre rapidement un traitement approprié ainsi que pour révéler leur incidence réelle. En médecine vétérinaire, ces méthodes de détection seraient très utiles pour surveiller les populations animales à risque. Aujourd'hui, ce sont les méthodes de détection immunologiques qui semblent le plus répondre à ces critères.

OBJECTIFS DES TRAVAUX DE THÈSE

Le Laboratoire d'Études et de Recherches en Immunoanalyse (LERI) est spécialisé dans la production d'anticorps monoclonaux et leurs utilisations à des fins analytiques dans différents domaines, dont entre autres la bio-défense et la détection de bactéries entéropathogènes. Plus récemment, le laboratoire a décidé d'évaluer le potentiel de certains anticorps pour une application thérapeutique en bio-défense. Ces thématiques s'intègrent dans le cadre du programme NRBC-E visant à lutter contre les risques Nucléaire, Radiologique, Biologique, Chimique et Explosif.

Le programme interministériel de recherche et de développement contre les risques NRBC-E a débuté en 2005 à la demande des pouvoirs publics. Il s'attache à développer des moyens de détection, identification, diagnostic, décontamination et contre-mesures médicales de la menace terroriste. La gouvernance scientifique de ce programme a été confiée au Commissariat à l'énergie atomique et aux énergies alternatives (CEA) à la demande du Secrétariat général de la défense et de la sécurité nationale (SGDSN) et en liaison avec la Direction générale de l'armement (DGA) au travers une trentaine de projets de recherche évalués par un comité scientifique. Le but est de répondre à un besoin urgent de sécurité vis-à-vis des agents de la menace terroriste en mettant au point plus particulièrement des tests de détection et de diagnostic ainsi que de nouveaux traitements et moyen de prophylaxie. Une partie de mon projet de thèse s'insère dans ce programme.

Premièrement, mon travail a porté sur le volet immunothérapie contre *Y. pestis*. Mise à part l'antibiothérapie, il n'existe aucun autre traitement commercialisé contre le bacille de la peste ce qui pose un important problème lorsque l'on sait que *Y. pestis* peut être utilisée à des fins terroristes et que des résistances aux antibiotiques sont apparues récemment. Dans ce contexte, l'immunothérapie contre *Y. pestis* pourrait être une bonne alternative pour traiter la peste bubonique et pulmonaire. Un des objectifs de cette thèse était de produire des anticorps monoclonaux murins contre trois protéines de l'injectisome (LcrV, YscF et YscC), un facteur de virulence clé des *Yersinia*. Les anticorps obtenus ont été caractérisés et pour certains leurs épitopes identifiés. Par la suite, en collaboration avec Elisabeth Carniel à l'Institut Pasteur, leur pouvoir neutralisant a été évalué *in vivo* dans un modèle murin de peste bubonique.

Ces anticorps monoclonaux murins contre LcrV et YscF de l'injectisome ont également été évalués dans un volet détection et diagnostic de *Y. pestis*. En effet, la méthode de référence pour le diagnostic de la peste est historiquement l'isolement par culture. Néanmoins, cette technique reste longue au regard de la rapidité de la maladie et n'est que difficilement applicable sur le terrain en zone d'endémie, en cas de conflit armé ou d'acte terroriste. Des techniques plus rapides ont été développées, en particulier basées sur l'immuno-détection (ELISA et tests bandelettes) mais ces tests peuvent présenter des limitations lorsque certaines souches virulentes sont dénuées de l'antigène sélectionné pour la détection. Ainsi, nos anticorps monoclonaux produits contre l'injectisome et

ciblant des antigènes retrouvés chez toutes les souches pathogènes ont été sélectionnés et évalués pour la mise au point d'un test de diagnostic rapide de *Y. pestis* dans différents fluides et échantillons biologiques.

Le dernier volet concerne la détection et le diagnostic des bactéries entéropathogènes *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*. Responsables d'infections entériques pouvant parfois donner de graves complications, leur diagnostic repose sur des méthodes bactériologiques qui sont longues et coûteuses et par conséquent souvent non effectuées. Un des objectifs de cette thèse était de développer des tests rapides de détection de ces bactéries. Pour cela, des anticorps monoclonaux murins contre les principaux biotypes et sérotypes pathogènes de *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* ont été produits. Après leur caractérisation, certains de ces anticorps monoclonaux ont été sélectionnés afin de développer des tests de diagnostic immunométriques (ELISA et tests bandelettes) rapides, spécifiques, sensibles et faciles à utiliser. Par ailleurs, ce dernier volet a fait l'objet d'un article scientifique nommé « Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays » publié dans le « Journal of Clinical Microbiology » en octobre 2014 (annexe 2).

MATÉRIEL ET MÉTHODES

I. LE MATÉRIEL BIOLOGIQUE UTILISÉ

1. Les bactéries

Les souches bactériennes utilisées au cours de la thèse sont recensées dans le tableau 6. Toutes les manipulations nécessitant l'utilisation de *Y. pestis* et de *Brucella* sont réalisées dans un laboratoire de sécurité biologique de niveau 3. Les cultures sont réalisées en milieu Lysogeny Broth (LB), Brain Heart Infusion (BHI), liquide ou gélosé, à 28°C ou 37°C. Pour les bactéries du genre *Brucella*, ce sont les géloses Trypticase Soy Agar (TSA) contenant 5% de sang de mouton (BioMérieux) qui sont utilisées. Les sélections (lorsque nécessaires pour les clonages utilisant le plasmide pET-22b) sont réalisées avec du milieu LB contenant 100 µg/mL d'ampicilline.

Les souches dont la dénomination commence par IP sont issues de l'unité de recherche *Yersinia* et du CNR *Yersinia* (Institut Pasteur, Paris, France) et celles commençant par CIP sont issues de la Collection de l'Institut Pasteur (Paris, France). L'origine des autres souches est indiquée dans le tableau 6.

Souches de référence <i>Yersinia</i>			
Espèce	Souche	Caractéristique	Origine
<i>Yersinia pestis</i>	NC00570	Souche Bombay 267, pYV+ pYV+ (186)	
	CO92		
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	IP31629	Sérotype I, pYV+	
	IP32953	Sérotype I, pYV-	
	IP33434	Sérotype III, pYV+	
	CIP55.88	Sérotype V, pYV+	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IP00383	Biosérotype 2/O:9, pYV+	
	IP00134	Biosérotype 4/O:3, pYV+	
	IP33592	Biosérotype 1A/NAG	
	CIP80.27	Biosérotype 1B/O:8, pYV+	
	CIP106676	Biosérotype 2/O:5,27, pYV+	
Autres souches <i>Yersinia</i>			
Espèce	Souche	Caractéristique	Origine
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	IP30636	Sérotype I	
	IP30642		
	IP30842		
	IP31630		
	IP32080		
	IP32414		
	IP32575		
	IP32654		
	IP32665		
	IP32670		
	IP32730		
	IP32907		
	IP32953		
	IP32989		
	IP33178		
	IP33242		
	IP33247		
	IP33424		
	IP33438		
	IP32651		
	IP32777		
	IP32784		
	IP32800		
	IP32906		
	IP32950		
	IP32953		
	IP33035		
	IP33053		
	IP33109		
	IP33285		
	IP33427		
	IP32554	Sérotype II	
	IP32584		
	IP32589		
	IP32598		
	IP32870		
	IP32951		
	IP33006		
	IP33047	Sérotype III	
	IP33098		
	IP33306		
	IP32666		
	IP32787		
	IP32976		
	IP32990		

	IP33049	
	IP33104	
	IP33185	
	IP33250	
	IP33297	
	IP33377	
	Ryster	Sérotype IV
	IP30103	
	IP30290	
	IP30291	
	IP30298	
	IP31411	
	IP31830	
	IP31833	
	IP32687	
	IP33234	
	IP32463	Sérotype V
	IP32699	
	IP32727	
	IP32814	
	IP32817	
	IP32821	
	IP32843	
	IP33061	
	IP33278	
	IP33397	
<i>Yersinia enterocolitica</i>	IP28114	Biosérotype 2/O:9
	IP29717	
	IP29193	
	IP29476	
	IP29523	
	IP29944	
	IP33498	
	IP33617	
	IP33949	
	IP34070	
	Ye21	IP
	IP4294	
	IP08896	Biosérotype 4/O:3
	IP10393	
	IP28096	
	IP28164	
	IP28983	
	IP29001	
	IP29310	
	IP29534	
	IP29610	
	IP33526	
	IP33550	
	IP33563	
	IP34075	
	IP34120	Biosérotype 2/O:5
	IP25166	Biosérotype 1A/NAG
	IP26014	Biosérotype 1A/O:7,8-8-8,19
	IP26309	Biosérotype 1A/O:10,34
	IP26618	Biosérotype 1A/O:5
	IP29463	Biosérotype 1A/O:6,30-6,31
	IP29465	Biosérotype 1A/O:41,42-41,43
	IP29469	Biosérotype 1A/O:12,25-12,26-25,35-35
	IP29845	Biosérotype 1A/NAG
	IP33764	Biosérotype 1A/O:12,25-12,26
	IP27875	Biosérotype 1A/O:3

<i>Yersinia similis</i>	CIP109846	Sérotype O:6	
	Kuratani-2	Sérotype O:1c	SPIPHE
	R116	Sérotype O:6	SPIPHE
	R2091-2	Sérotype O:7	SPIPHE
	R2031	Sérotype O:11	SPIPHE
<i>Yersinia wautersii</i>	Y428	Sérotype O:4a	TLV
	#51	Sérotype O:4a	SPIPHE
	WP-930601	Sérotype O:11	SPIPHE
	WP-931205	Sérotype O:11	SPIPHE
	12-219N1	Sérotype O:15	SPIPHE

Autres souches

Espèce	Souche	Caractéristique	Origine
<i>Shigella sonnei</i>	CIP67,63	Lysotype 4	
<i>Salmonella enterica</i>	CIP104474	Sérotype Typhimurium	
<i>Brucella abortus</i>	NCTC10503	Biotype 4	
<i>Brucella melitensis</i>	NCTC10508	Biotype 2	
	NCTC10509	Biotype 3	
<i>Escherichia coli</i>	BL21	F <i>ompT hsdS_B</i> (r _B -m _B ⁻) <i>gal dcm</i> (DE3)	Invitrogen
	DH5α	F ϕ 80 <i>lacZ</i> ΔM15 Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169 <i>deoR recA1 endA1 hsdR17</i> (r _K ⁻ , m _K ⁻) <i>phoA supE44 thi-1 gyrA96 relA1 λ</i> ⁻	Invitrogen
	BL21 (<i>yscF</i>)	Souche transformée par le plasmide pET-22b(+) portant le gène <i>yscF</i>	Cette étude
	BL21 (<i>yscC</i>)	Souche transformée par le plasmide pET-22b(+) portant le gène <i>yscC</i>	Cette étude
	BL21 (<i>lcrV</i>)	Souche transformée par le plasmide pET-22b(+) portant le gène <i>lcrV</i>	Cette étude

Tableau 6 : Souches bactériennes utilisées.

NAG : non-agglutinable.

NCTC : National Collection of Type Culture, Health Protection Agency, Angleterre.

TLV : souche du Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz, Bad Langensalza, Allemagne.

SPIPHE : souche du Shimane Prefectural Institute of Public Health and Environmental Science, Matsue, Japon.

2. Les anticorps

Les anticorps monoclonaux murins (AcMs) utilisés sont produits au laboratoire (tableau 7).

Nom	Nombre d'AcMs obtenus	Immunogène	Origine
LcrV	15	Protéine recombinante LcrV	Cette étude
YscF	9	Protéine recombinante YscF	Cette étude
YscC	17	Protéine recombinante YscC	Cette étude
Ye	15	<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 et 4/O:3	Cette étude
Ye3	13	<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	Cette étude
Yps	14	<i>Y. pseudotuberculosis</i> I et III	Cette étude
Yps1	17	<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	Cette étude
Yp	6	<i>Y. pestis</i>	Étude précédente

Tableau 7 : dénomination et caractéristiques des anticorps monoclonaux.

II. L'OBTENTION DES ANTICORPS MONOCLONAUX

1. L'immunisation des souris

Les immunogènes sont dispensés avec de l'alum par injection intrapéritonéale à des souris Biozzi (animalerie CEA Saclay). Lorsque des bactéries sont utilisées comme immunogène, elles sont préalablement inactivées par un traitement à la chaleur (65°C, 1 h 30).

Avant l'injection, une ponction sanguine est effectuée (saignée pré-immune S_0) pour servir de contrôle négatif. Une deuxième ponction est réalisée deux semaines après la première immunisation (saignée S_1). Trois injections de rappel sont réalisées à intervalle d'un mois, ainsi que la réalisation de ponctions après chaque rappel (saignées S_2 , S_3 et S_4). Les réponses immunitaires (anticorps spécifiques de l'immunogène) sont évaluées et permettent la sélection des souris présentant le plus fort titre en anticorps. Une semaine avant la fusion, trois dernières injections dites « boost » sont réalisées par voie intraveineuse.

2. L'obtention des hybridomes par fusion

Les fusions sont réalisées selon la technique de Köhler et Milstein (294), manuellement ou à l'aide de l'automate Freedom EVO (Tecan). Les souris sélectionnées pour la fusion sont sacrifiées afin de prélever leur rate riche en splénocytes. Ces cellules sécrétrices d'anticorps sont lavées puis mélangées à des cellules de myélome murin (NS1) dans des proportions 3:1. Après centrifugation et élimination du surnageant, le culot est remis en suspension dans du polyéthylène glycol (PEG 400), permettant la fusion membranaire. Les cellules sont lavées et reprises en milieu sélectif Hypoxanthine-Aminoptérine-Thymidine (HAT). Elles sont ensuite réparties en microplaques de culture et incubées à 37°C, 7% CO₂ (milieu RPMI, 15% SVF). Dans ces conditions, seules les cellules hybrides, appelées hybridomes, sont capables de proliférer. Après sept à dix jours, la présence d'anticorps spécifiques de l'immunogène dans le surnageant de culture est mesurée à l'aide d'un test immuno-enzymatique spécifique pour chaque immunisation.

Les hybridomes sécréteurs d'anticorps spécifiques sont clonés par la méthode de « dilution limite » de façon à obtenir une population unique de cellules sécrétant le même anticorps (anticorps monoclonal).

3. L'obtention des anticorps monoclonaux dans le liquide d'ascite et isotypage

Les hybridomes sélectionnés sont mis en culture jusqu'à confluence et injectés par voie intrapéritonéale à des souris BALB/c-nu. Les liquides d'ascite produits sont récupérés par ponction du péritoine. Les liquides d'ascite sont azidés à 0,1% et conservés à -20°C.

L'isotypage des AcMs obtenus est réalisé avec le kit « Pierce Rapid ELISA Mouse Antibody Isotyping » (Thermo Scientific) selon les consignes du fournisseur.

III. LE CLONAGE DES GÈNES *YSCC*, *YSCF* ET *LCRV*

1. L'extraction de l'ADN plasmidique

Les bactéries *Y. enterocolitica* 2/O:9 sont cultivées sur des boîtes gélosées durant 48 heures à 28°C. L'ADN plasmidique est extrait selon le protocole « Preparation of plasmid DNA by alkaline Lysis with SDS: Minipreps » [3]. La concentration en ADN est mesurée avec le spectrophotomètre BioPhotometer (Eppendorf) et la présence d'ADN est contrôlée par électrophorèse des échantillons dans un gel d'agarose 1% préparé en tampon TAE (Tris 40 mM, acide acétique 5%, EDTA 10 mM, pH 8) et coloré au bromure d'éthidium (BET). Les échantillons sont conservés à -20°C.

2. L'amplification de l'ADN par PCR

Les réactions de polymérisation en chaîne (PCR) sont réalisées avec le kit Phusion High-Fidelity DNA Polymerase (Finnzymes). Chaque réaction contient une unité de Phusion DNA Polymerase, son tampon (1X), 0,5 µM de chaque amorce (tableau 8), 200 µM de chaque dNTP et 500 ng d'ADN plasmidique selon les recommandations du fournisseur. Le programme de PCR est composé d'une première étape de dénaturation à 98°C durant 30 s, suivie de 30 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 98°C durant 10 s, une hybridation à 50°C durant 30 s et une élongation à 72°C durant 45 s, puis une phase finale d'élongation à 72°C durant 7 min. Toutes les étapes sont réalisées avec l'appareil GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). L'électrophorèse des produits de PCR est effectuée dans un gel d'agarose à 1 ou 2% préparé en tampon TAE contenant du BET. Les amorces utilisées portent un site *NdeI* dans le codon d'initiation et un site *XhoI* à la place du codon-stop, permettant l'insertion en phase avec une séquence codant une étiquette poly-histidine dans le vecteur pET-22b (+).

Gène cible	Nom	Séquence nucléotidique
<i>lcrv</i>	<i>lcrv_nde1</i>	5'-ggagatata catatg attagacctacgaacaaaac-3'
	<i>lcrv_xho1</i>	5'-gtggtggtg ctcgag cctcgtgcatctagcagacg-3'
<i>yscf</i>	<i>yscf_nde1</i>	5'-ggagatata catatg agtaatttctctgggttg-3'
	<i>yscf_xho1</i>	5'-gtggtggtg ctcgagt gggaacttctgtaggatgcc-3'
<i>yscc</i>	<i>yscc_nde1</i>	5'-ggagatata catatg gctttccgctacattc-3'
	<i>yscc_xho1</i>	5'-gtggtggtg ctcgagt acgccacgcttaggtgc-3'

Tableau 8 : Amorces utilisées.

3. La préparation des produits de PCR et du vecteur pET-22b(+)

Les fragments d'amplification sont purifiés à partir du gel d'agarose avec le kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel). Ils sont ensuite digérés par les enzymes *NdeI* et *XhoI* à 37°C durant 1 h 30 puis les enzymes sont inactivées à 65°C durant 20 min.

Le sous-clonage des gènes *yscc*, *yscf* et *lcrv* a été effectué dans le vecteur pET-22b(+) (Novagen, annexe 1). Ce plasmide porte un gène de résistance à l'ampicilline. Son site multiple de clonage est situé en aval du promoteur du phage T7 et en amont d'une étiquette poly-histidine. Trois µg de vecteur sont également digérés par les enzymes *NdeI* et *XhoI* dans les mêmes conditions. Les produits d'amplification et les vecteurs digérés sont purifiés après migration dans un gel d'agarose à 1%. Les bandes de gel contenant les inserts digérés et le vecteur linéarisé sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel).

4. Le clonage dans le vecteur pET-22b(+) et la transformation des bactéries compétentes

La réaction de ligature entre le vecteur pET22-b(+) linéarisé et les inserts, obtenus après amplification par PCR et digestion enzymatique, est réalisée avec le kit Quick Ligation (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Après une incubation de 10 min à température ambiante, 5 µL de la réaction de ligature sont ajoutés à 50 µL de bactéries chimio-compétentes *E. coli* BL21(DE3) (Invitrogen). Après 30 min d'incubation dans de la glace pour favoriser la liaison de l'ADN à la membrane des cellules, un choc thermique à 42°C durant 45 s est effectué pour permettre l'entrée de l'ADN dans ces cellules qui sont ensuite remises dans de la glace durant 2 min. Puis 500 µL de « Super Optimal Broth with Catabolite repression » (SOC, Invitrogen) sont ajoutés aux bactéries transformées pour une incubation d'une heure sous agitation à 37°C. Au final, 50 µL et 300 µL de la suspension bactérienne sont étalés sur des géloses LB/ampicilline. Les bactéries sont cultivées à 37°C durant la nuit.

5. Le criblage des clones de bactéries recombinantes

Les colonies présentes sur les géloses LB/ampicilline sont criblées par PCR, pour vérification de l'insertion du plasmide contenant le gène d'intérêt. Pour cela, les colonies sélectionnées sont resuspendues dans 10 µL d'eau et cette suspension est incubée durant 5 min à 95°C afin de lyser les bactéries. Les PCR sont réalisées avec le kit Crimson Taq DNA Polymerase (New England Biolabs) selon les recommandations du fournisseur. Le programme de PCR comporte une première étape de dénaturation à 95°C durant 5 min, suivie de 30 cycles d'amplification comprenant une dénaturation à 95°C durant 30 s, une hybridation à 60°C durant 30 s et une élongation à 68°C durant 20 s, puis une phase finale d'élongation à 68°C durant 5 min. Toutes les étapes sont réalisées avec l'appareil GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems). Le contrôle de la taille des produits d'amplification est réalisé par électrophorèse dans un gel d'agarose à 1 ou 2% préparé en tampon TAE/BET.

6. La purification et la vérification des plasmides recombinants

Après culture liquide des bactéries transformées sélectionnées, l'ADN plasmidique est extrait avec le kit NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel) selon les recommandations du fournisseur. Les séquences d'intérêt sont ensuite vérifiées par séquençage (Eurofins MWG).

IV. LA PRODUCTION DES PROTÉINES RECOMBINANTES YSCC, YSCF ET LCRV

1. Le test de contrôle d'expression avec induction à l'IPTG

Un test d'expression « rapide » permettant de vérifier la production par les bactéries des protéines recombinantes est réalisé avant la production en plus grandes quantités. Pour cela, des pré-cultures de bactéries sélectionnées sont réalisées en milieu liquide LB/ampicilline à 37°C sous agitation. Lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ atteint 0,4, 0 mM, 0,1 mM ou 0,5 mM d'isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside (IPTG) sont ajoutés (incubation à 37°C sous agitation la nuit). Les bactéries sont récupérées par centrifugation durant 10 min à 1500 x g, lavées avec du tampon TE (tampon Tris-HCl 10 mM, pH 8 contenant 10 mM d'EDTA). Après sonication, les bactéries lysées sont centrifugées 10 min à 22 000 x g et les corps d'inclusion contenus dans les culots lysés avec un tampon TE contenant 6M d'urée. Après une deuxième sonication, des dilutions en série de ces lysats sont réalisées dans du PBS (tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7.4, NaCl 0,15 M) et utilisées pour une adsorption passive (voir VI.1.2. La préparation des phases solides) sur les plaques de

microtitration. Un test ELISA direct est ensuite réalisé sur ces plaques, afin de vérifier la présence de protéines recombinantes (voir VI.2.1. Les test ELISA). Une fois identifiées les meilleures conditions d'expression des protéines recombinantes, celles-ci sont utilisées pour la production et la purification de ces protéines.

2. La préparation des corps d'inclusion

Des cultures des bactéries produisant les protéines recombinantes YscC, YscF ou LcrV sont réalisées dans 400 mL de milieu LB/ampicilline à 37°C sous agitation. L'IPTG est ajouté à la concentration optimale de 1 mM lorsque la $DO_{600\text{ nm}}$ est comprise entre 0,4 et 0,8 puis les bactéries sont cultivées 3 h de plus. Les cultures sont centrifugées 15 min à 4000 x g et le culot repris et lavé avec du tampon de sonication constitué de tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8, NaCl 0,1 M et un inhibiteur de protéases AEBSF 1 mM (Interchim). Après sonication, les bactéries lysées sont centrifugées 15 min à 14 000 x g et les culots contenant les corps d'inclusion sont solubilisés avec du tampon de solubilisation (tampon Tris 50 mM, pH 8, NaCl 0,2M, urée 8M) par agitation durant la nuit à 4°C. Le lysat est centrifugé 10 min à 20 000 x g. Le surnageant qui contient les protéines solubilisées et dénaturées est récupéré puis 10 mM d'imidazole sont ajoutés (tampon de liaison).

3. La purification des protéines recombinantes possédant l'étiquette poly-histidine par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel

La purification est effectuée sur une colonne Chelating Sepharose Fast Flow (Ni-NTA, GE Healthcare) chargée en ions Ni^{2+} préparée selon les instructions du fournisseur. Le surnageant obtenu précédemment est mis en contact avec la colonne préparée durant une nuit à 4°C. Puis la colonne est lavée avec du tampon de liaison et l'élution des protéines recombinantes en fractions de 1 mL est réalisée en tampon d'élution (tampon Tris 50 mM, pH 8, NaCl 0,2 M, urée 8M, imidazole 0,5 M) après incubation de chaque fraction 5 min à température ambiante. L'absorbance des différentes fractions est mesurée à 280 nm afin de déterminer la présence de protéines. Les fractions sélectionnées sont regroupées et dialysées contre du tampon PBS (tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7.4, NaCl 0,15 M) la nuit à 4°C, contenant optionnellement du détergent 3-(*N,N*-Dimethyloctylammonio) propanesulfonate (SB3-8, Sigma-Aldrich) pour la dialyse de la protéine recombinante YscC. La pureté des protéines recombinantes est ensuite évaluée par électrophorèse en gel SDS (SDS-PAGE) et coloration au bleu de Coomassie avec le système Phast (Pharmacia) et leur concentration est déterminée par mesure de leur absorbance à 280 nm avec le système NanoDrop (Thermo Scientific). Les échantillons contenant les protéines recombinantes sont conservés à -20°C.

V. LES ANALYSES BIOCHIMIQUES

1. La purification d'anticorps monoclonaux par chromatographie d'affinité sur protéine A

Les liquides d'ascite contenant les AcMs d'isotype IgG ou IgM sont dilués v/v avec du tampon de liaison constitué de tampon borate 0,1 M, pH 8,5, NaCl 0,15 M. Un volume de 5 mL d'échantillon est mis en contact avec 2 mL de protéine A fixée sur des billes de sépharose (ProsepA, Millipore) durant 1 h à température ambiante. Puis les billes sont lavées avec 10 volumes de colonne de tampon de liaison. Les anticorps sont élués en différentes fractions de 1 mL de tampon glycine 0,1 M, pH 3 qui est immédiatement neutralisé dans les tubes par addition de 500 µL tampon phosphate de potassium 1 M, pH 7,4. L'absorbance des différentes fractions est mesurée à 280 nm afin de déterminer celles qui contiennent des protéines. Les fractions sélectionnées (les plus concentrées en anticorps) sont regroupées et dialysées contre du tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,4 la nuit à 4°C. La pureté des AcMs est évaluée par SDS-PAGE avec le système Phast (Pharmacia) et leur concentration est déterminée par mesure de leur absorbance à 280 nm avec le système NanoDrop (Thermo Scientific). Les AcMs sont conservés à -20°C.

Les AcMs destinés aux expérimentations *in vivo* sont purifiés avec une HPLC ÄKTAexpress (GE Healthcare) au moyen d'une colonne contenant de la protéine A fixée sur du sépharose (rProtein A Sepharose Fast Flow, GE Healthcare) et une colonne de dessalage (HiPrep 26/10 Desalting, GE Healthcare) selon les recommandations du fournisseur. Les AcMs sont récupérés en tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4, NaCl 0,15 M. La pureté et la concentration des AcMs sont évaluées de la même façon que celle décrite précédemment.

2. L'analyse SDS-PAGE et l'immunoblot

Avant l'électrophorèse en gel d'acrylamide, certains échantillons contenant des bactéries du genre *Yersinia* subissent un traitement avec 80 µg de protéine K (Bio-Rad) pour traiter 10⁹ cfu dans 1 mL durant 30 min à 37°C.

Les échantillons sont dénaturés en tampon Laemmli (295) composé de tampon Tris-HCl 31 mM, pH 6,8, SDS 1%, glycérol 12,5% et bleu de bromophénol 0,005% (concentrations finales, Laemmli Sample Buffer, Bio-Rad) additionné de 5% de β-mercaptoéthanol dans les conditions réduites, à 95°C pendant 5 min. L'électrophorèse est effectuée en gel de polyacrylamide 13% contenant du laurylsulfate de sodium (SDS-PAGE) à 150 V durant 1 h 30. Après migration, les échantillons sont transférés à température ambiante sur une membrane de PVDF (Amersham Biosciences) à 25 V durant la nuit ou à 100 V durant 4 h.

Par la suite, l'étape de saturation, les lavages, et l'incubation des anticorps primaire et secondaire sont effectués manuellement ou avec le système SNAP-id (Millipore). De façon manuelle, la membrane est saturée avec du TBS contenant 0,1% de Tween 20 (TBST) et 5 % de lait écrémé en poudre (Régilait) durant 30 min à température ambiante. Après deux lavages avec du TBST, la membrane est incubée avec 4 µg/mL d'anticorps primaire contenu dans du TBST avec 1% de lait écrémé en poudre durant 20 min à température ambiante. Après trois lavages avec du TBST, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort (Stabilized goat anti-mouse IgG (H+L) Horse Radish Peroxidase, Thermo Fisher) dilué au 1:5000 dans du TBST contenant 3% de lait écrémé en poudre durant 20 min à température ambiante. Après trois lavages avec du TBST et un lavage supplémentaire avec du TBS, les bandes sont détectées par chimioluminescence après l'ajout du réactif ECL (Amersham Biosciences) ou Luminata Forte (Millipore) pendant 5 min à température ambiante, puis exposition avec un film photographique (X-omat, Kodak).

Le SNAP-id est quant à lui utilisé selon les recommandations du fournisseur : le tampon de lavage est composé de PBS (tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7.4, NaCl 0,15 M) contenant 0,1% de Tween 20 (PBST) auquel est ajouté 0,3% de lait écrémé en poudre pour le tampon de saturation. L'anticorps primaire est utilisé à 20 µg/mL, l'anticorps secondaire au 1:500, dilués dans le tampon de saturation. La révélation est réalisée comme décrite précédemment.

3. La détermination des épitopes de reconnaissance des anticorps

Les séquences protéiques de LcrV, YscF et YscC sont synthétisées selon la technique SPOT (296) sur des membranes de cellulose sous la forme de spots de peptides de 8 acides aminés, de l'extrémité N-terminale vers l'extrémité C-terminale et dont chaque séquence chevauche la précédente de 6 acides aminés (avec un décalage de 2 acides aminés entre chaque peptide) grâce à l'appareil AutoSpot (IntavisAG) et selon les consignes du fournisseur.

A la fin de la synthèse, la membrane est saturée avec du lait écrémé en poudre, lavée, puis utilisée pour de l'immunoblot (incubée avec l'anticorps primaire, dont on veut déterminer l'épitope de reconnaissance, puis l'anticorps secondaire couplé à la peroxydase du raifort), et les spots peptidiques reconnus sont révélés par chimioluminescence selon un protocole manuel identique à celui utilisé pour le Western Blot (voir ci-dessus).

VI. LES DOSAGES IMMUNOMÉTRIQUES

1. La préparation des tests immuno-enzymatiques

1.1. Les tampons et le matériel utilisé

Tous les tests immuno-enzymatiques sont effectués dans des plaques de microtitration MaxiSorp 96 puits (Nunc).

Les réactifs et les échantillons sont dilués en tampon EIA, composé de tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,4, NaCl 0,15 M, BSA 0,1% et azide de sodium 0,01%.

Le tampon de lavage est composé de tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4, contenant 0,05% de Tween 20 (excepté pour les plaques contenant des bactéries). Chaque lavage est réalisé avec 400 μ L de tampon par puits.

1.2. La préparation des phases solides

Les phases solides sont préparées par adsorption passive des protéines à leur surface. Les protéines (anticorps ou protéines recombinantes) sont diluées en tampon phosphate de potassium 50 mM, pH 7,4 à la concentration adéquate (10 μ g/mL pour les anticorps, 1 μ g/mL pour les protéines recombinantes) puis déposées dans les puits des plaques de microtitration (120 μ L par puits). Après adsorption la nuit à température ambiante, les puits sont vidés et saturés avec du tampon EIA (3 h à température ambiante ou 18 h à 4°C) et les plaques sont stockées en tampon EIA à 4°C. Un lavage est effectué avant chaque utilisation.

Les bactéries entières cultivées en milieu liquide ou solide sont diluées dans de l'eau pour obtenir une concentration de 2×10^8 cfu/mL. 50 μ L des solutions bactériennes sont ensuite déposées dans chaque puits des plaques de microtitration et mis à sécher complètement sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). La veille de leur utilisation, les puits sont saturés avec du tampon EIA (3 h à température ambiante ou 18 h à 4°C). Un lavage est effectué avant chaque utilisation.

1.3. Les traceurs

Le couplage des protéines à la biotine

Les AcMs (ou les protéines recombinantes) sont couplés à la biotine de façon covalente pour être utilisés comme traceurs. Une quantité de 0,67 nmole de protéine dans du tampon borate 0,1M, pH 8,5 est incubée avec 13,3 nmoles (ratio=20) d'ester de biotine-N-hydroxysuccinimide (Sigma-Aldrich) dissous en diméthylformamide anhydre (DMF) (400 μ L final). La réaction est stoppée après 30 min à

température ambiante par ajout de 100 µL de tampon Tris-HCl 1M, pH 8 durant 30 min. Enfin, 500 µL de tampon EIA sont ajoutés pour atteindre une concentration de 100 µg/mL et la préparation est aliquotée et conservée à -20°C.

Le couplage des anticorps à l'acétylcholinestérase

Les AcMs sont couplés à l'acétylcholinestérase (AChE, E.C. 3.3.1.7) pour être utilisés comme traceurs selon le protocole décrit (297). Les anticorps d'isotype IgG1 sont fragmentés et réduits en F(ab')₂ par pepsinolyse puis réduits en F(ab') par le β-mercaptoéthanol (Sigma-Aldrich) pour rendre les groupes thiols accessibles. Les anticorps d'isotype IgG2 sont thiolés avec le N-succinimidyl-S-acétyl-thioacétate (SATA, Sigma-Aldrich) et les thiols sont ensuite déprotégés par l'hydroxylamine (Sigma-Aldrich). Les AcMs réduits sont purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne Séphadex G-25 (GE Healthcare).

L'AChE est extraite des organes électriques de l'anguille *Electrophorus electricus*, purifiée par chromatographie d'affinité, puis sa forme tétramérique globulaire est obtenue par trypsinolyse. Des groupements maléimide sont introduits dans la forme tétramérique globulaire de l'AChE par réaction avec le N-succinimidyl-4-(N-maléimidométhyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC, Sigma-Aldrich). Les AcMs sont couplés de façon covalente à l'AChE par réaction entre les groupements thiol et maléimide. Les AcMs couplés à l'AChE sont purifiés par chromatographie d'exclusion stérique sur colonne (Bio-Gel A 1,5 M, Bio-Rad).

La mesure de l'activité enzymatique

L'activité enzymatique de l'AChE couplée à l'anticorps est mesurée en utilisant la méthode d'Ellman (298). Le réactif d'Ellman, utilisé comme substrat de l'AChE, comprend un mélange d'acétylthiocholine iodide $7,5 \times 10^{-4}$ M et de l'acide dithio-bis-nitrobenzoïque (DTNB oxydé) $2,5 \times 10^{-4}$ M dans du tampon phosphate de potassium 0,1 M, pH 7,4. La thiocholine produite par l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'AChE forme un pont disulfure avec le DTNB, formant alors un produit appelé 3-thio-6-nitrobenzoate (DTNB réduit ou TNB⁻) qui en solution aqueuse à pH 7,4 est ionisé en TNB²⁻ de couleur jaune qui absorbe à 414 nm (299). L'activité enzymatique est exprimée en Unités Ellman (UE), 1 UE étant définie comme la quantité d'AChE induisant une augmentation de l'absorbance d'une unité pendant 1 min dans 1 mL de milieu contenant le substrat (réactif d'Ellman) pour un trajet optique de 1 cm à 25°C (298).

2. Les tests immuno-enzymatiques

2.1. Les tests ELISA

Les tests sur phase solide CAS

Les anticorps à tester dans les saignées de souris immunisées (100 μ L/puits) ou dans les surnageants de culture d'hybridomes (50 ou 100 μ L/puits) sont transférés dans des plaques de microtitration revêtues avec des anticorps polyclonaux de Chèvre Anti-immunoglobulines de Souris Ig(G+M) (CAS, Jackson ImmunoResearch) et incubés la nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois, puis 100 μ L/puits de la solution contenant l'antigène à tester (protéines avec étiquette poly-histidine) avec 10% d'ascite d'Ehrlich (mélange d'immunoglobulines préparé au laboratoire afin de saturer les anticorps CAS) sont ajoutés pendant 2 à 3 h à température ambiante ou la nuit à 4°C. Après trois lavages, 100 μ L/puits du traceur à 2 UE/mL (anticorps anti-Poly-His-AChE) avec 10% d'ascite d'Ehrlich sont ajoutés. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois et 200 μ L/puits de réactif d'Ellman sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 min ou 1 h de réaction à température ambiante.

Ce format de test (figure 13) est utilisé pour la titration des saignées de souris immunisées avec les protéines LcrV, YscF et YscC et pour le criblage des anticorps contre les protéines LcrV, YscF et YscC produits dans le surnageant des cultures d'hybridomes.

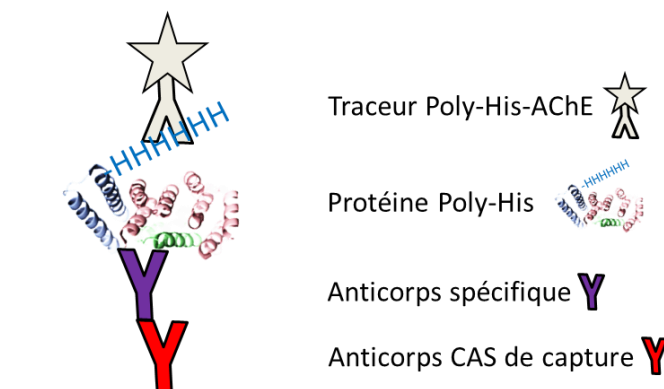


Figure 13 : Test immunométrique sur plaque CAS.

Les AcMs purifiés (100 μ L/puits) sont transférés dans des plaques de microtitration revêtues avec des anticorps polyclonaux CAS et incubés la nuit à 4°C. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois, puis 100 μ L/puits de la solution contenant l'antigène à tester sont ajoutés (protéines biotinylées) et incubés la nuit à 4°C. Après trois lavages, 100 μ L/puits du traceur à 2 UE/mL (streptavidine-AChE) sont ajoutés. Les plaques sont ensuite lavées 3 fois et 200 μ L/puits de réactif d'Ellman sont ajoutés. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 min de réaction à température ambiante.

Ce format de test (figure 14) est utilisé pour la recherche de contaminants dans les échantillons de protéines recombinantes LcrV, YscF et YscC.

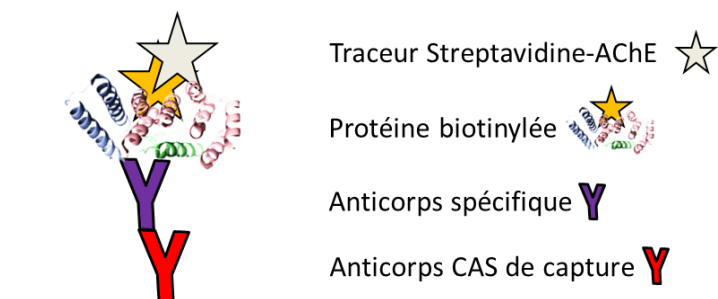


Figure 14 : Test immunométrique sur plaque CAS.

L'ELISA direct

Les anticorps présents dans les saignées de souris immunisées (100 µL/puits), dans les surnageants des cultures d'hybridomes (50 ou 100 µL/puits), ou les AcMs biotinylés (100 ng/mL, 50 µL/puits) sont incubés dans une plaque de microtitration revêtue de bactéries la nuit à 4°C. Après 3 lavages, 100 µL/puits du traceur à 2 UE/mL (CAS-AChE qui permet la détection des anticorps de souris fixés aux bactéries, ou streptavidine-AChE) sont ajoutés et incubés pendant 1 ou 2 h à température ambiante puis la plaque est lavée 3 fois. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 min ou 1 h de réaction avec 200 µL/puits de réactif d'Ellman.

Ce format de test est utilisé pour la titration des saignées de souris immunisées avec les bactéries *Yersinia* (figure 15A), pour le criblage des anticorps contre les *Yersinia* produits dans les surnageants des cultures d'hybridomes (figure 15A), pour le criblage des anticorps produits dans les surnageants des cultures d'hybridomes contre la protéine YscC exprimée à la surface de la bactérie *Y. pestis* (deuxième immunisation) (Figure 15A), et pour l'analyse de la sensibilité des AcMs produits contre LcrV, YscF et YscC natifs présents à la surface de la bactérie *Y. pestis* (Figure 15B).

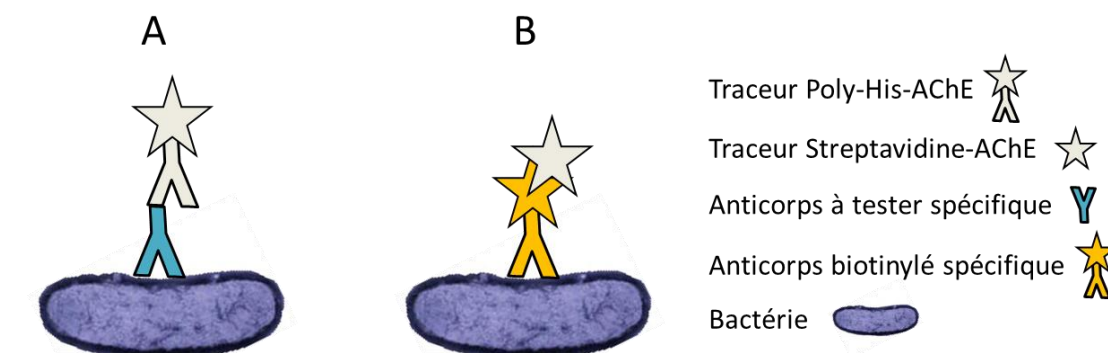


Figure 15 : ELISA direct.

2.2 Les tests immunométriques à deux sites (appelés aussi dosage sandwich ou ELISA sandwich)

Ce test utilise un anticorps immobilisé sur la phase solide (anticorps de capture spécifique de l'antigène à tester) et un anticorps couplé à la biotine (anticorps traceur) pour révéler la présence d'un complexe avec l'antigène. Ainsi, 50 μL /puits de solutions à tester (antigènes pouvant être des protéines, des bactéries, etc...) et 50 μL /puits d'anticorps traceur (anticorps biotinylés, 200 ng/mL) sont déposés simultanément dans une plaque de microtitration revêtue de différents anticorps de capture. Après une réaction la nuit à 4°C, les plaques sont lavées 3 fois avant l'ajout de streptavidine-AChE à 2 UE/mL pendant 2 h à température ambiante. L'absorbance à 414 nm est mesurée après 30 min ou 1 h de réaction avec 200 μL /puits de réactif d'Ellman. Une alternative à ce test est une incubation séquentielle (et non pas simultanée) des solutions d'antigène et d'anticorps traceur.

Ce test (figure 16) est utilisé lors des analyses combinatoires des AcMs produits au cours de cette étude. Les deux AcMs utilisés dans ce format (anticorps de capture et traceurs) sont dirigés contre le même antigène afin d'évaluer leur compatibilité épitopique (contre une protéine) ou leur spécificité (contre les bactéries), ainsi que leur sensibilité.

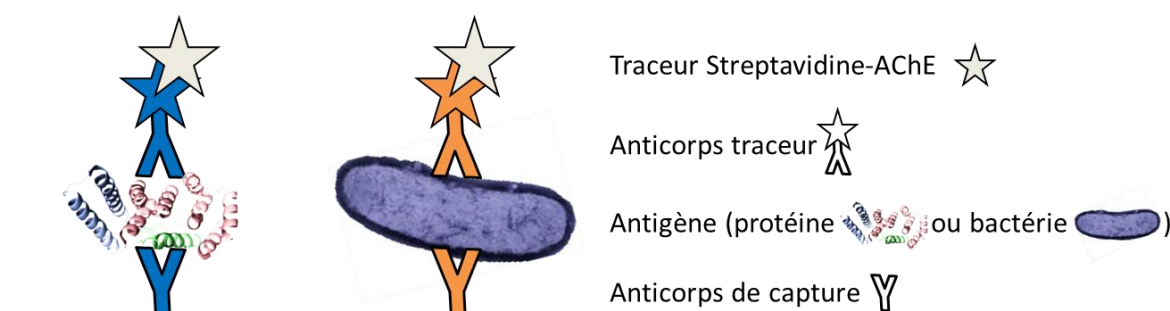


Figure 16 : Test immunométrique à deux sites.

2.3. Le test immuno-enzymatique optimisé

Ce test est réalisé en optimisant le test immunométrique à deux sites (figure 16). Ainsi, 100 μL de l'échantillon bactérien ou protéique simultanément avec 100 μL de traceur (AcM d'intérêt couplé à l'AChE) à la concentration finale de 2 ou 5 UE/mL sont distribués dans les puits des plaques de microtitration contenant un AcM de capture. Les plaques de microtitration sont optionnellement centrifugées à 1 000 x g durant 5 min, puis incubées durant 30 min ou 3 h à température ambiante. Après 3 lavages, 200 μL /puits de réactif d'Ellman sont ajoutés pendant 30 min à température ambiante avant la mesure de l'absorbance à 414 nm.

Pour le test optimisé utilisant les bactéries, chaque mesure en duplicats est effectuée trois fois de façon indépendante. L'analyse statistique des valeurs obtenues lors de la mesure de l'absorbance à 414 nm est réalisée par le test t de Student non apparié. La fonction « five-parameter logistic fit (5-PL) » (GraphPad Prism 5) est utilisée pour calculer et tracer la courbe standard permettant de calculer la limite de détection (LoD). Celle-ci est définie comme la concentration produisant un signal correspondant à la moyenne du signal non spécifique additionnée de trois fois la déviation standard de cette moyenne.

3. Les tests immuno-chromatographiques (ou tests bandelettes)

3.1. La préparation des bandelettes

Les bandelettes sont composées de trois parties fixées ensemble sur un support plastique (figure 17A) : une zone de dépôt de l'échantillon en fibre de verre (Standard 14, Whatman), une zone de réaction constituée d'une membrane de nitrocellulose (Prima 40, Whatman ou Hi-Flow Plus 75, Millipore) et une zone d'absorption en cellulose (Cellulose grade 470, Whatman). Deux types d'anticorps sont immobilisés sur la zone de réaction : i) des AcMs produits lors de cette étude et dirigés contre l'antigène d'intérêt formant la ligne test, ii) des anticorps CAS formant la ligne contrôle et permettant de valider que le test s'est déroulé correctement. Les bandelettes peuvent être logées dans des cassettes plastiques afin de faciliter l'utilisation du test (figure 17B).

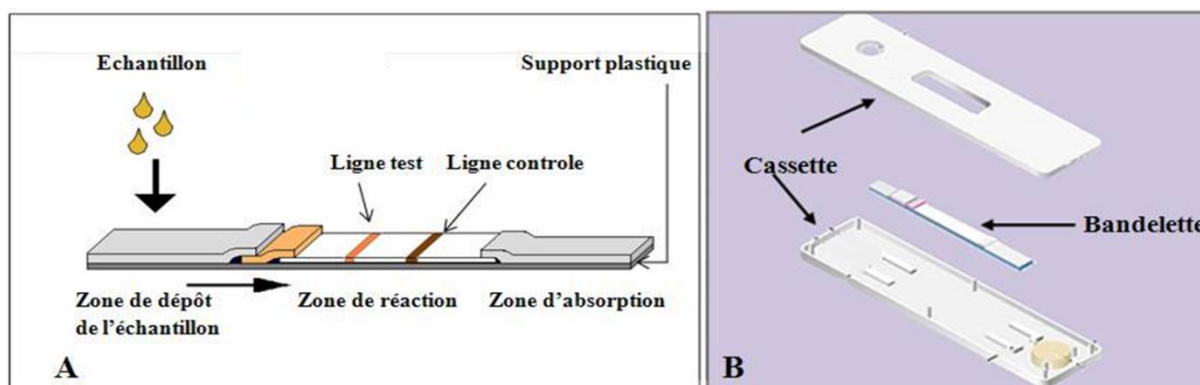


Figure 17 : Description des bandelettes. (A) Les différents composants d'une bandelette. (B) La bandelette logée dans une cassette.

Les solutions d'anticorps, en tampon phosphate 0,05 M, pH 7,4 à la concentration de 1 ou 2 mg/mL, sont distribuées à raison de 1 μ L/cm sur la membrane de nitrocellulose par un distributeur automatisé (Airjet XYZ 3050, BioDot).

Après un séchage de 1 h à 40°C dans une étuve sèche, la membrane de nitrocellulose est immergée dans une solution de blocage constituée de PBS (tampon phosphate de sodium 10 mM pH 7,4, NaCl 0,15 M, NaN_3 0.01% contenant 0,5% de BSA durant 30 min à température ambiante. Puis la

membrane est lavée deux fois avec de l'eau déminéralisée et incubée dans une solution de préservation constituée de PBS contenant 0,1% de Tween 20 et 7,5% de glucose durant 20 min à température ambiante. La membrane est ensuite séchée durant 20 min à 40°C dans une étuve. Après avoir fixé respectivement les membranes d'absorption et de dépôt respectivement en haut et en bas de la membrane de nitrocellulose, le montage est découpé en bandelettes de 5 mm de largeur à l'aide d'une guillotine automatisée (Guillotine Cutting, CM4000, BioDot). Les bandelettes sont conservées hermétiquement à l'abri de la lumière et à température ambiante jusqu'à utilisation.

3.2. La préparation des anticorps traceurs couplés à l'or colloïdal

Les AcMs traceurs sont marqués à l'or colloïdal afin d'obtenir un signal optique de couleur violette. Le mélange de 25 µL d'AcM à 1 mg/mL avec 100 µL de tampon borax 20 mM, pH 9,3 et 1 mL d'une solution d'or colloïdal (Sigma-Aldrich) est mis à réagir sous rotation durant 1 h à température ambiante. Puis 100 µL de tampon borax 20 mM, pH 9,3 contenant 1% de BSA sont ajoutés et le mélange est centrifugé à 15 000 x g durant 50 min. Le culot est suspendu par sonication dans 1 mL de tampon borax 2 mM, pH 9,3 contenant 1% de BSA. Après une nouvelle centrifugation à 15 000 x g durant 50 min, le culot est suspendu par sonication dans 250 µL de tampon borax 2 mM, pH 9,3 contenant 1% de BSA. Les AcMs traceurs couplés ainsi à l'or colloïdal sont conservés à 4°C et à l'abri de la lumière.

3.3. La réalisation du test immuno-chromatographique

Les réactifs et les échantillons sont dilués en tampon d'analyse composé de tampon EIA contenant 0,5% de Tween 20.

Les échantillons à tester sont distribués dans une plaque de microtitration 96 puits (Greiner Bio One) à raison de 100 µL/puits auxquels sont ajoutés 10 µL de l'AcM traceur couplé à l'or colloïdal. Après 10 min d'incubation à température ambiante, les bandelettes sont insérées dans chaque puits. La migration de l'échantillon s'effectue par capillarité de la membrane de dépôt vers la membrane d'absorption. Après 30 min de migration, la coloration violette sur la ligne test et la ligne contrôle est estimée visuellement (figure 18). Si l'antigène d'intérêt est présent dans l'échantillon testé, un signal colorimétrique violet est obtenu au niveau de la ligne test. La ligne contrôle est constituée d'anticorps dirigés contre l'anticorps traceur et un signal colorimétrique violet est obtenu pour indiquer que l'échantillon testé a correctement migré le long de la bandelette.

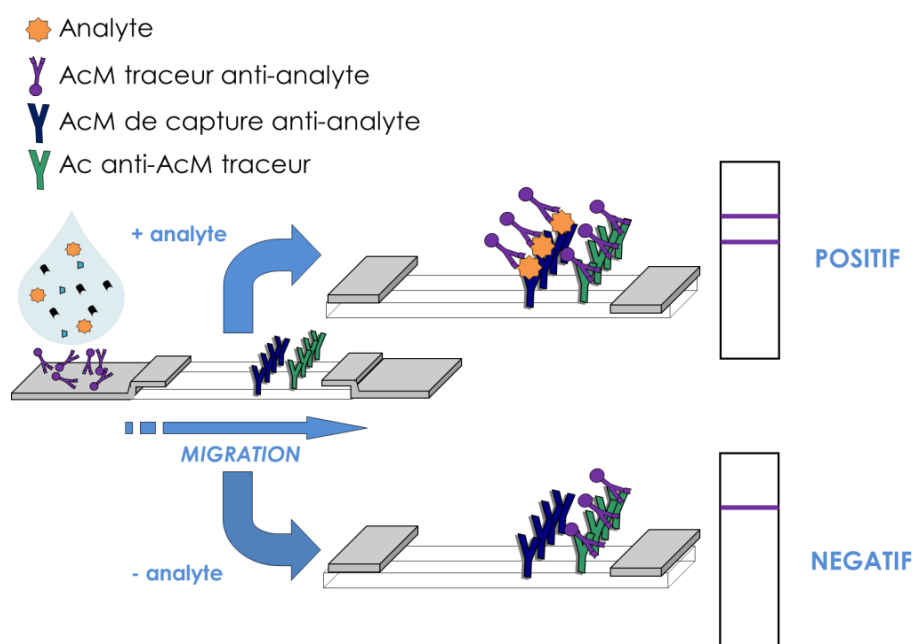


Figure 18 : Principe du test immuno-chromatographique.

4. La détection dans des matrices biologiques artificiellement contaminées

Des échantillons sont testés dans différentes matrices biologiques telles que l'urine, le plasma de souris et les fèces humains.

La détermination de la sensibilité des tests utilisant ces matrices est réalisée par ajout artificiel des protéines recombinantes LcrV et YscF dans ces matrices. Celles-ci sont diluées directement dans l'urine ou le plasma murin à la concentration recherchée. Les dilutions en série sont effectuées dans la même matrice ou dans du tampon EIA pour les tests immuno-enzymatiques, additionné de 0,5% de Tween 20 pour les tests immuno-chromatographiques.

Pour les fèces, l'équivalent d'un pois, correspondant à 1 g de fèces issu d'un individu sain, est dilué dans 10 mL de tampon EIA pour les tests immuno-enzymatiques ou 10 mL de tampon EIA contenant 0,5% de Tween 20 pour les tests test immuno-chromatographiques. Des cultures d'une nuit de *Y. enterocolitica* ou de *Y. pseudotuberculosis* sont réalisées sous agitation (220 rpm) à 28°C et 37°C. Leur concentration est estimée par mesure de la $DO_{600\text{ nm}}$ et ajustée à 5×10^7 cfu/mL (en considérant $DO_{600\text{ nm}} = 1$ correspond à 5×10^8 cfu/mL pour les *Yersinia* entéropathogènes (50)) dans la matrice fèces. Les dilutions en série sont effectuées dans la même matrice tampon.

VII. LES TESTS *IN VITRO* ET *IN VIVO*

1. Les tests *in vitro* de neutralisation de *Y. pestis*

Le test de mesure de la cytotoxicité

Ce test est effectué à l'aide du kit Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche). Il permet la quantification de cellules mortes et lysées. Le signal mesuré est proportionnel à l'activité lactate déshydrogénase (LDH) dans le surnageant de culture, proportionnelle au nombre de cellules endommagées libérant l'enzyme de leur cytosol.

Le test de mesure de la viabilité cellulaire

Ce test est effectué à l'aide du kit CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay (Promega). Il permet de quantifier les cellules viables. Le signal obtenu est proportionnel à la quantité d'ATP cellulaire dont la présence révèle un métabolisme cellulaire intact.

La réalisation

Les cellules épithéliales humaines HeLa ou monocytes/macrophages murins J774A.1 sont cultivés à 37°C avec 5% de CO₂ dans du milieu RPMI 1640 sans rouge de phénol (Gibco) supplémenté en GlutaMAX et contenant 10% de sérum de veau fœtal décomplémenté (Gibco) et un mélange de pénicilline à 100 U/mL et de streptomycine à 100 µg/mL (Gibco). Les cellules sont distribuées dans des plaques 96 puits à raison de 10⁵ cellules/puits et incubées 24 h sans antibiotique. Les cellules sont ensuite lavées 3 fois avec du milieu RPMI 1640 à 37°C afin de retirer toute trace de sérum et d'antibiotiques.

Les bactéries du genre *Yersinia* sont cultivées en milieu liquide sous agitation durant 18 h à 37°C. Elles sont récupérées par centrifugation à 1000 x g pendant 5 min et reprises dans du milieu RPMI 1640. La concentration bactérienne est estimée par mesure de la DO_{600 nm} et ajustée afin d'obtenir les concentrations voulues. Les AcMs purifiés sont ajoutés à différentes concentrations aux solutions bactériennes et sont incubés à 37°C durant 30 min puis 100 µL sont déposés dans les puits contenant les cellules.

Les infections sont réalisées en triplicats. Les cellules infectées sont immédiatement centrifugées à 200 x g durant 5 min afin d'augmenter le contact bactéries-cellules, puis incubées la durée voulue (2 à 4 h) à 37°C avec 5% de CO₂. Optionnellement, certains triplicats reçoivent un traitement à la gentamicine à 20 µg/mL afin de tuer les bactéries extracellulaires.

La mesure de la cytotoxicité cellulaire est réalisée par lecture de signaux optiques à 492 nm des surnageants de culture des cellules infectées, puis comparée à un échantillon témoin composé de

cellules seules (cytotoxicité minimale) et de cellules lysées avec du Triton X-100 (cytotoxicité maximale).

La mesure de la viabilité cellulaire est mesurée par luminescence de l'échantillon complet de cellules infectées, puis comparée à un échantillon témoin composé de cellules seules (viabilité maximale).

2. Les tests *in vivo* de protection des anticorps monoclonaux

Les tests de protection *in vivo* sont réalisés par l'Unité de Recherche *Yersinia* à l'Institut Pasteur de Paris par Sofia Filali et le Dr Christian Demeure sous la direction du Dr Elisabeth Carniel.

La capacité protectrice de certains AcMs contre *Y. pestis* est évaluée dans un modèle murin. Des groupes de 7 ou 8 souris femelles de la lignée OF1 (Charles River) sont utilisés pour chaque condition testée. Des solutions stériles contenant 500 µg des AcMs utilisés seuls ou en combinaison (500 µg d'AcM de type IgM ou 2 x 250 µg d'AcM de type IgG) en tampon phosphate de potassium 10 mM, pH 7,4 contenant 0,15 M de NaCl sont injectées par voie intrapéritonéale à chaque souris avant l'infection (J-1), suivies d'une dose thérapeutique à J+1 et J+3. L'infection est effectuée à J0 par injection sous-cutanée de 100 cfu de *Y. pestis* CO92 (10 x DL₅₀) et la mortalité est enregistrée quotidiennement durant 21 jours. Les courbes de survie sont analysées de façon statistique avec le test du Log-rank de Mantel-Cox.

RÉSULTATS

PARTIE I : LES ANTICORPS MONOCLONAUX DIRIGÉS CONTRE LE SYSTÈME DE SÉCRÉTION DE TYPE III DE *YERSINIA PESTIS*

I. La production et la caractérisation des anticorps monoclonaux dirigés contre le système de sécrétion de type III

1. Le choix des antigènes

Trois protéines constituant l'injectisome du système de sécrétion de type III ont été choisies comme cible afin de produire des anticorps monoclonaux. Les deux premières, LcrV et YscF ont fait preuve de leur fort potentiel immunogène et des anticorps monoclonaux possédant un effet neutralisant ont déjà été obtenus (voir Introduction générale). La troisième, la protéine YscC, a été choisie pour plusieurs raisons : elle est essentielle à la sécrétion des protéines effectrices Yops et elle est localisée au niveau de la membrane externe (300). Du fait des fortes identités de séquences de ces protéines entre les différentes *Yersinia* (*pestis*, *pseudotuberculosis* et *enterocolitica* dans le tableau 9) et pour des raisons pratiques, les gènes de ces trois protéines ont été clonés à partir de *Y. enterocolitica* 2/O:9, insérés dans le plasmide d'expression pET-22b(+) (Annexe 1) et les protéines produites dans la bactérie *E. coli* BL21, puis purifiées au moyen de l'étiquette poly-histidine sur colonne Ni-NTA.

<i>Y. enterocolitica</i>	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. pestis</i>
	LcrV	
	97,7%	97,7%
	YscF	
	96,6%	96,6%
	YscC	
	98,3%	98,3%

Tableau 9 : Homologie des séquences des protéines LcrV, YscF et YscC de *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis*.

2. La production et le criblage des anticorps monoclonaux

L'immunisation et la fusion

Pour produire des AcMs neutralisants contre l'injectisome, des souris Biozzi sont immunisées avec les protéines recombinantes LcrV, YscF et YscC lors de trois différentes campagnes d'immunisation (4 souris par immunisation). Pour chaque immunisation, les deux souris présentant les meilleures réponses immunitaires, c'est-à-dire les meilleurs titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma (figure 19), sont choisies afin d'effectuer la fusion entre ses splénocytes et les cellules de myélome murin NS1.

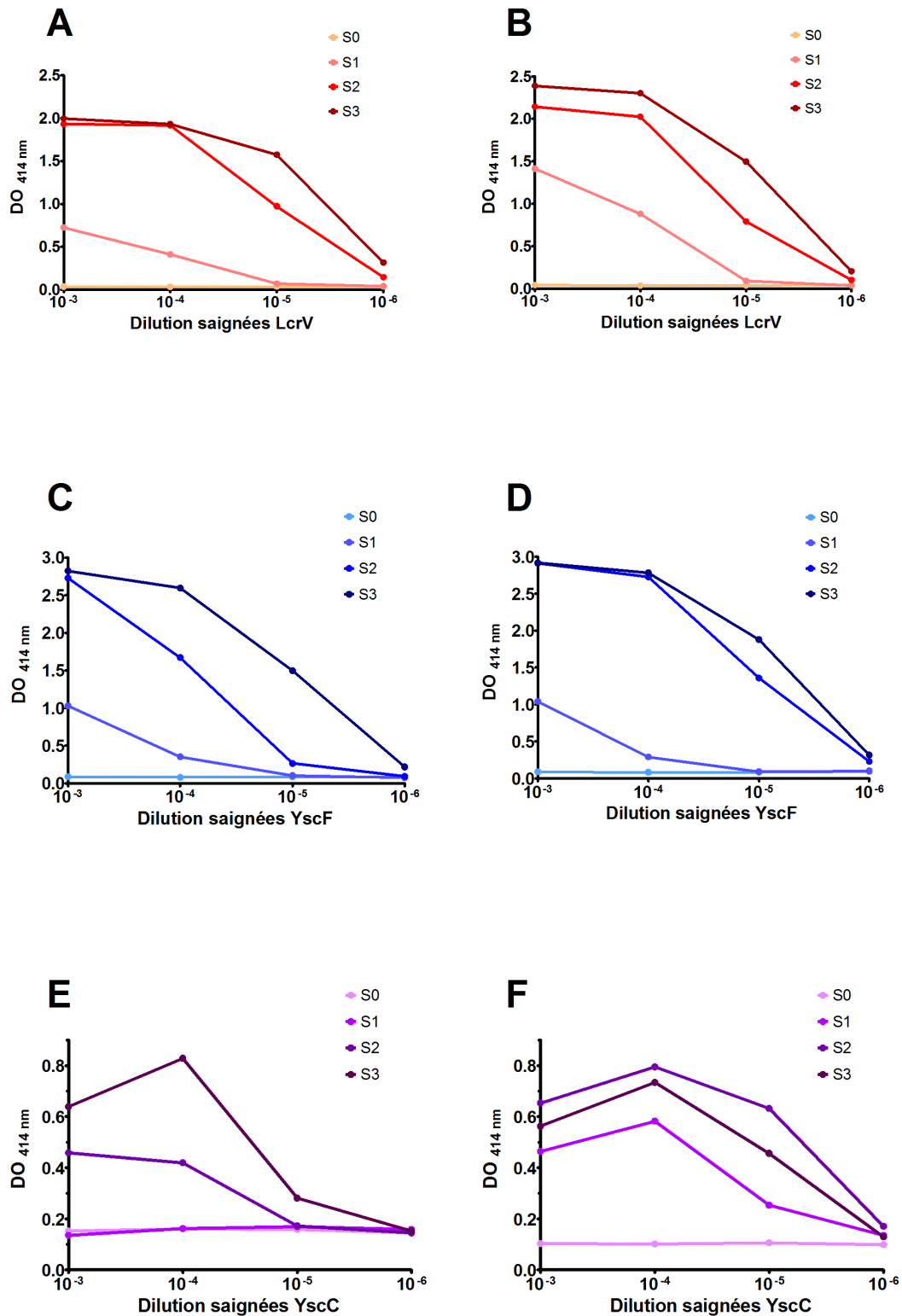


Figure 19 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA sur plaque CAS (principe du test voir figure 13) avec les différentes saignées diluées en tampon EIA. (A) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec la protéine recombinante LcrV. (B) Saignées de la souris Biozzi n°3 avec la protéine recombinante LcrV. (C) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec la protéine recombinante YscF. (D) Saignées de la souris Biozzi n°2 avec la protéine recombinante YscF. (E) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec la protéine recombinante YscC. (F) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec la protéine recombinante YscC.

Les hybridomes obtenus sont sélectionnés par visualisation des plaques de fusion au microscope. L'immunisation avec YscF permet l'obtention de 63 hybridomes. Pour les immunisations LcrV et YscC, le nombre d'hybridomes obtenus est respectivement de 1605 et de 1784.

La sélection des hybridomes

Afin d'identifier les hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre les protéines recombinantes utilisées pour l'immunisation, leurs surnageants de culture sont criblés par ELISA direct. Pour les immunisations LcrV et YscF, le criblage est réalisé directement avec les protéines recombinantes correspondantes. Pour l'immunisation YscC, le criblage est différent. C'est un double criblage effectué avec la souche *E. coli* BL 21 (*yscc*) et avec la souche *E. coli* BL21 afin de pouvoir détecter les anticorps reconnaissant la protéine à la surface membranaire de la bactérie, si elle est présente. Cette stratégie avait précédemment été utilisée avec succès pour l'obtention d'anticorps dirigés contre la protéine PLA (167).

Pour l'immunisation YscF, seuls 4 hybridomes sont sélectionnés alors que 96 hybridomes sont gardés pour chacune des immunisations LcrV et YscC.

Le clonage des hybridomes

Par la suite, ces hybridomes sélectionnés sont clonés par dilution limite. Des criblages identiques par ELISA direct sont effectués à chaque étape du clonage et jusqu'à l'obtention de populations clonales afin de ne conserver que les hybridomes sécrétant des AcMs contre les protéines recombinantes LcrV, YscF et YscC.

Au final, ce sont 17, 2 et 15 hybridomes qui sont sécréteurs d'AcMs dirigés respectivement contre les protéines LcrV, YscF et YscC.

L'obtention des anticorps monoclonaux

Les hybridomes obtenus sont injectés à des souris BALB/c-nu afin de produire les AcMs sous forme de liquide d'ascite. Ceux-ci sont purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A. Les AcMs obtenus sont appelés LcrV, YscF et YscC suivi du numéro de clone correspondant (par exemple l'AcM dirigé contre YscF qui est produit par le clone numéro 1 est appelé YscF1) (tableau 10).

La nouvelle immunisation YscF

Le nombre d'hybridomes sécrétant des anticorps contre la protéine recombinante YscF étant insuffisant, les deux souris non utilisées pour la fusion précédente (souris Biozzi n°3 et n°4, figure 20) sont sacrifiées pour une nouvelle fusion effectuée selon le même protocole.

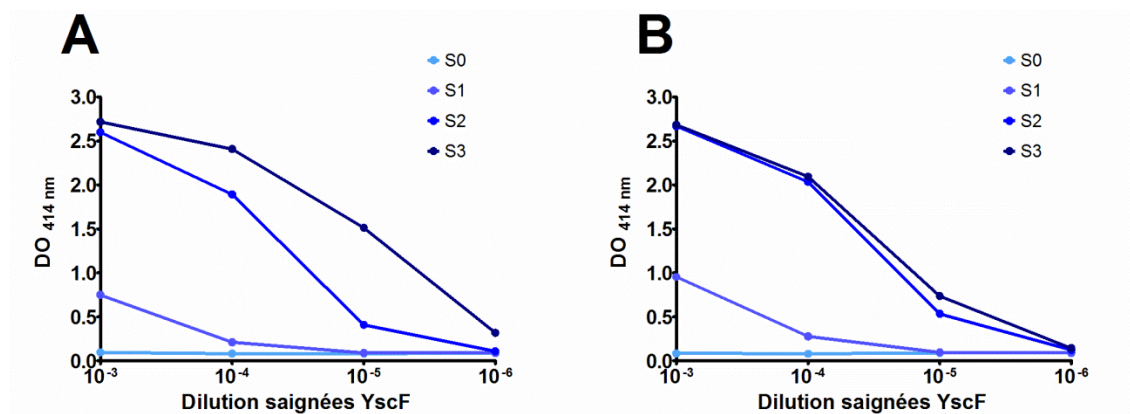


Figure 20 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA sur plaque CAS (principe du test voir figure 13) avec les différentes saignées diluées en tampon EIA. (A) Saignées de la souris Biozzi n°3 avec la protéine recombinante YscF. (B) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec la protéine recombinante YscF.

489 hybridomes sont identifiés au microscope dont 7 s'avèrent sécréteurs d'anticorps spécifiques. Ces AcMs sont appelés YscF1 suivi du numéro de clone correspondant (par exemple l'AcM dirigé contre YscF qui est produit par le clone numéro 1 est appelé YscF11) (tableau 10).

Nom	Isotype	Nom	Isotype	Nom	Isotype
LcrV1	IgG1	1ère immunisation		YscC42	IgG1
LcrV2	IgG1	YscF1	IgG2b	YscC43	IgG1
LcrV3	IgG1	YscF2	IgG1	YscC45	inconnu
LcrV4	IgG1	2ème immunisation		YscC46	IgG1
LcrV5	IgG1	YscF11	IgM	YscC47	IgG2b
LcrV11	IgG1	YscF12	IgG1	YscC50	IgG2b
LcrV12	IgG1	YscF13	IgG1	YscC58	IgG2b
LcrV14	IgG1	YscF14	IgM	YscC62	IgG1
LcrV16	IgG1	YscF15	IgG1	YscC63	IgG1
LcrV17	IgG1	YscF16	IgG1	YscC65	IgG1
LcrV20	IgG2b	YscF17	IgM	YscC66	IgG2b
LcrV21	IgG1			YscC67	IgG1
LcrV22	IgG1			YscC68	IgG1
LcrV24	IgG1			YscC69	IgG2b
LcrV26	IgG1			YscC70	IgG2c
LcrV27	IgG1				
LcrV31	IgG1				

Tableau 10 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux anti-LcrV, anti-YscF et anti-YscC produits.

3. La recherche des épitopes

3.1. L'immunoblot avec la protéine recombinante

Dans le but de déterminer si les 17 AcMs anti-LcrV, les 9 AcMs anti-YscF et les 15 AcMs anti-YscC produits sont capables de reconnaître la protéine recombinante ayant servi d'immunogène, des immunoblots sont réalisés. Les 17 AcMs anti-LcrV reconnaissent une bande située autour de 38 kDa (poids moléculaire théorique de la protéine native) ainsi que deux bandes moins intenses autour de 25 kDa (exemple de profil obtenu représenté avec l'AcM LcrV22 ; figure 21A). La reconnaissance de deux bandes fines autour de 25 kDa semble correspondre à l'existence de deux méthionines (en position 119 et 122) sur la partie N-terminale de la séquence en acides aminés de la protéine LcrV qui initient des séquences protéiques d'une taille de 24,6 et 24,3 kDa.

Les 9 AcMs anti-YscF reconnaissent quatre bandes. Une bande avec un signal de forte intensité correspond à la taille attendue (environ 7 kDa) et trois autres bandes correspondant au dimère (environ 14 kDa) et aux autres multimères de la protéine YscF (figure 21B pour l'anticorps YscF2 représentatif des résultats obtenus avec les autres anticorps anti-YscF). En effet, cette protéine YscF, native ou recombinante, est capable d'oligomériser (275, 301).

Cependant, avec les 15 AcMs anti-YscC, un « smear » de haut poids moléculaire apparaît avec une forte intensité entre 75 et 100 kDa (exemple avec l'AcMs YscF42, figure 21C) à la place de la forme monomère attendue d'un poids moléculaire apparent de 60kDa (300).

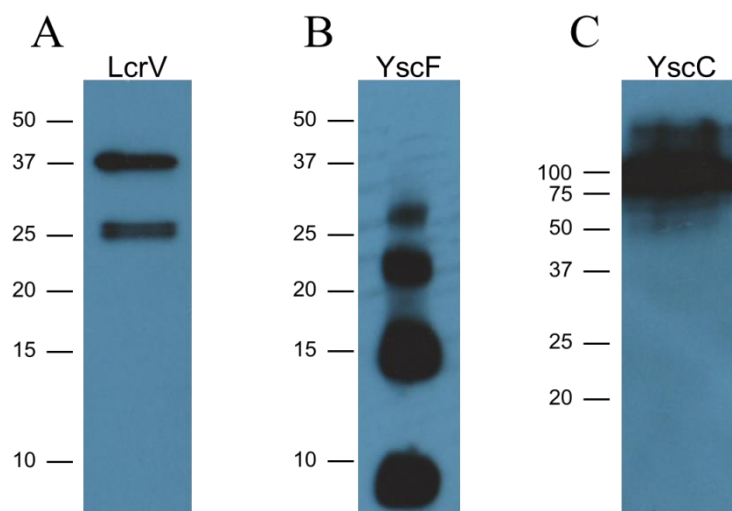


Figure 21 : Immunoblots avec des protéines recombinantes. L'échelle sur la gauche indique les poids moléculaires des standards. (A) Immunoblot utilisant la protéine recombinante LcrV et l'anticorps LcrV22. (B) Immunoblot utilisant la protéine recombinante YscF et l'anticorps YscF2. (C) Immunoblot utilisant la protéine recombinante YscC et l'anticorps YscC42.

3.2. La caractérisation des épitopes de reconnaissance des anticorps

L'« épitope mapping » des AcMs anti-LcrV réalisés sur les membranes contenant des peptides synthétisés ne permet pas la caractérisation des 17 AcMs anti-LcrV.

L'« épitope mapping » des AcMs anti-YscF permet de caractériser les 9 AcMs anti-YscF (exemple avec l'AcM YscF12, figure 22). Tous sont dirigés contre des peptides linéaires situés dans cinq régions différentes. Ces cinq régions épitopiques dans la séquence d'acides aminés de la protéine YscF sont nommées de A à E (figure 23A). La séquence en acides aminés de la protéine YscF de *Y. enterocolitica* utilisée pour la synthèse des spots peptidiques est comparée à celle de *Y. pestis*, et il apparaît que les séquences en acides aminés de deux *Yersinia* sont identiques pour les cinq régions épitopiques (figure 23B).

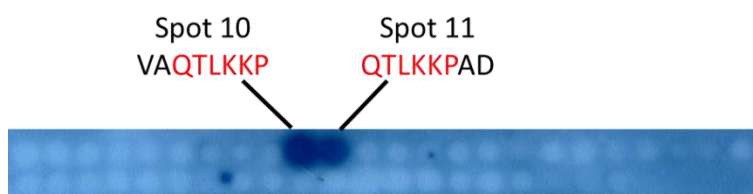
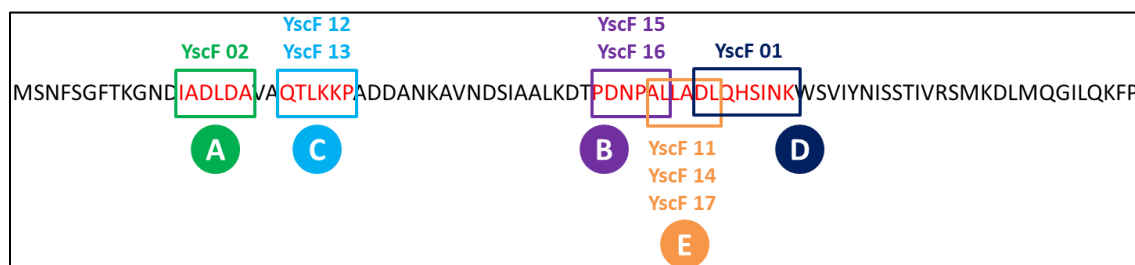


Figure 22 : Caractérisation par « épitope mapping » des épitopes reconnus par l'anticorps YscF12 sur la membrane YscF. La séquence commune des spots peptidiques reconnus, qui détermine l'épitope, est notée en rouge.

A



B

<i>Y. enterocolitica</i>	MSNFSGFTKGNDIADLDAVAQTLKKPADANKAVNDSIAALKDTPDNPALLADLQHSINK
<i>Y. pestis</i>	MSNFSGFTKGTDIADLDAVAQTLKKPADANKAVNDSIAALKDKPDNPALLADLQHSINK
	*****.*****
<i>Y. enterocolitica</i>	WSVIYNISSTIVRSMKDLMQGILQKFP
<i>Y. pestis</i>	WSVIYNINSTIVRSMKDLMQGILQKFP
	*****.*****

Figure 23 : Régions épitopiques de la séquence en acides aminés reconnues par « épitope mapping ». (A) Régions de la séquence en acides aminés de la protéine YscF (Accession number WP_010891228) reconnues par « épitope mapping » des AcMs anti-YscF. (B) Alignement des séquences en acides aminés de la protéine YscF de *Y. enterocolitica* et *Y. pestis* (Accession number WP_002212916).

Aucun signal n'a été obtenu lors de l'« épitope mapping » des 15 AcMs anti-YscC.

L'« épitope mapping » des plasmas des souris immunisées.

L'« épitope mapping » des saignées S_0 et S_3 des souris immunisées et sélectionnées pour les différentes fusions est également réalisé sur les membranes contenant les peptides synthétisés afin d'étudier si les régions épitopiques reconnues par les anticorps polyclonaux sont identiques à celles reconnues par les AcMs sélectionnés par la suite.

Tout d'abord, l'utilisation des saignées S_0 ne révèlent pas de spots sur les membranes. À l'inverse avec les saignées S_3 , certains anticorps polyclonaux contre la protéine LcrV (figure 24A) ou YscF (figure 24B) sont dirigés contre des peptides linéaires. Ces peptides sont situés dans différentes régions particulières des protéines qui semblent ainsi plus immunogènes.

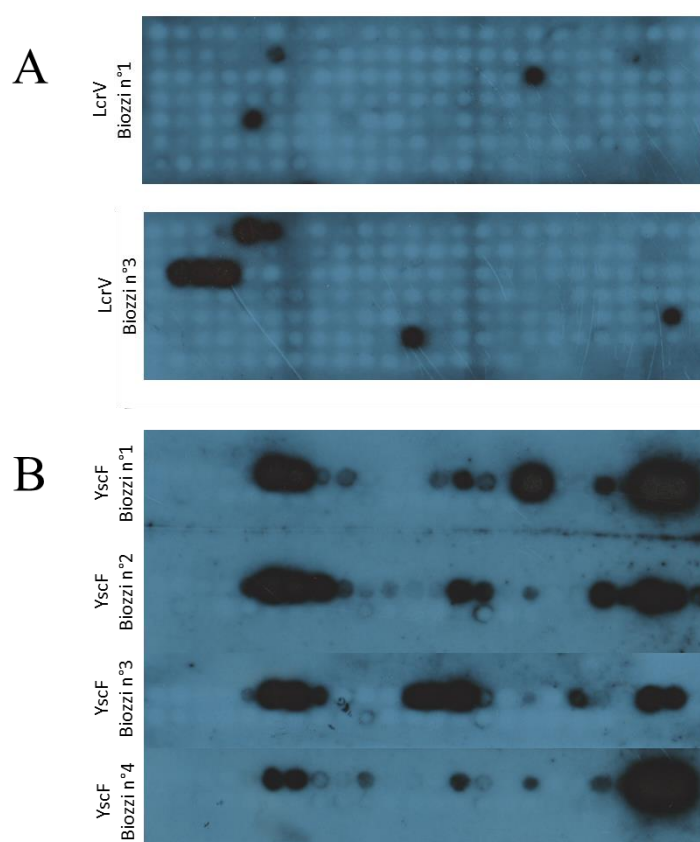


Figure 24 : Caractérisation par « épitope mapping » des épitopes reconnus par les saignées S_3 des souris immunisées et sélectionnées pour les fusions. (A) Membrane LcrV. (B) Membrane YscF.

La comparaison entre l'« épitope mapping » des AcMs anti-YscF et celui des anticorps polyclonaux des souris ayant servi à la production de ces anticorps monoclonaux est effectuée. Les régions A, B, C et E révélées par les AcMs sont aussi retrouvées avec l'« épitope mapping » des saignées (figure 25B), montrant une relative homogénéité dans les réponses polyclonales des 4 souris (régions immunogéniques prédominantes) et la corrélation avec les anticorps monoclonaux sélectionnés issus de ces réponses immunitaires.

A LcrV

MIRAYEQNPQHFIEDLEKVRVEQLTGHGSSVLEELVQLVKDKKIDISIKYDPKKDSEVFADRVITDDIELLKK
ILAYFLPEDAILKGGHYDNQLQNGIKRVKEFLESSPNTQWELRAFMVAMHFSLTADRIDDDILKVIIVDSMNH
GDARGKLREELAELTAELKIYSVIAEINKHLSNSDTINIHDKSINLMDKNLYGYTDEEIFKASA EYKILEKM
PQTTIKEGETEKKIVSIKNFLESENKRTGALGNLKDSYSYNKDNNELSHFATTCSDKSRPLNDLVSQKTTQLS
DITSRFNSAIEALNRFIQKYDSVMQRLLDDTR

B YscF

MSNFSGFTKGNDIADLDAVAQTLKKPADANKAVNDSIAALKDTPDNPALLADLQHSINKWSVIYNISSTIVR
SMKDLMQGILQKFP

Figure 25 : Régions épitopiques de la séquence en acides aminés reconnues par « épitope mapping » des saignées des souris immunisées. Les acides aminés en rouges sont impliqués dans les régions immunogènes. (A) Séquence protéique de LcrV (Accession number WP_010891210). (B) Séquence protéique de YscF (Accession number WP_010891228).

4. La reconnaissance des cibles par des anticorps monoclonaux en ELISA

La spécificité de tous les AcMs obtenus pour leur cible est vérifiée avec un double criblage par ELISA entre la souche *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome (pYV+) et la souche de *E. coli* BL21 avec laquelle ont été produites les protéines recombinantes ayant servi à l'immunisation (principe du test voir figure 15B). Tous les AcMs biotinylés anti-LcrV et anti-YscF (1 µg/mL) permettent d'obtenir un signal positif pour la détection de *Y. pestis* et ne permettent pas la détection de *E. coli* BL21 (figure 26A). Seuls quatre AcMs (LcrV11, YscF11, 14 et 15) présentent un signal pour la détection de *E. coli* BL21. Cependant, l'intensité de ce signal est bien inférieure à celle obtenue pour la détection de *Y. pestis*. De plus, à des concentrations inférieures d'anticorps biotinylés (0,1 µg/mL), le signal pour la détection de *Y. pestis* perdure alors qu'il disparaît pour la détection de *E. coli* BL21 (figure 26B).

Bien que les AcMs biotinylés anti-YscC (1 µg/mL) permettent la détection de *Y. pestis*, ils reconnaissent également *E. coli* BL21 (figure 26A) avec l'obtention de signaux d'intensité supérieure pour certains des AcMs (tableau 11). À des concentrations inférieures d'anticorps biotinylés anti-YscC (0,1 µg/mL), le signal pour la détection de *E. coli* BL21 perdure alors qu'il disparaît pour la détection de *Y. pestis*. Ces résultats confirment les résultats obtenus en immunoblot et en « épitope mapping ». Les AcMs « anti-YscC » produits ne sont donc pas spécifiques de la protéine YscC de l'injectisome de *Y. pestis* et sont probablement dirigés contre des immunogènes contaminants présents dans la préparation protéique ayant servi d'immunogène.

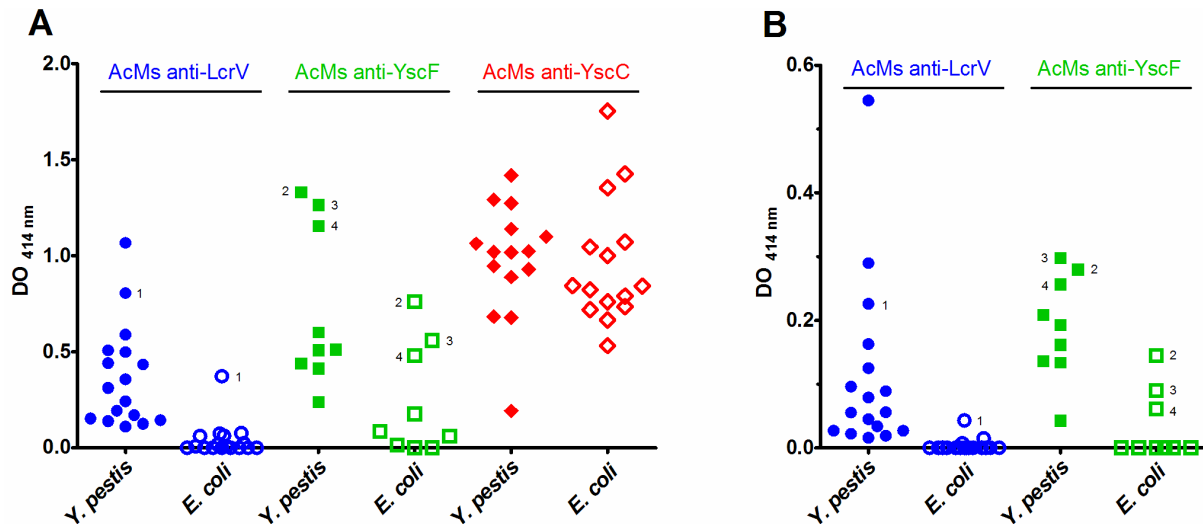


Figure 26 : Test ELISA des AcMs anti-LcrV (bleu), anti-YscF (vert) et anti-YscC (rouge) avec *Y. pestis* NC00570 ou *E. coli* BL21 adsorbées sur la phase solide. Chaque symbole correspond à un AcM différent. (A) Les anticorps biotinylés sont utilisés à la concentration de 1 µg/mL. Les AcMs donnant un fort signal sont annotés. 1 : LcrV11 ; 2 : YscF15 ; 3 : YscF14 ; 4 : YscF11. (B) Les anticorps biotinylés sont utilisés à la concentration de 0,1 µg/mL. Les AcMs donnant un fort signal sont annotés. 1 : LcrV22 ; 2 : YscF15 ; 3 : YscF14 ; 4 : YscF11

Anticorps biotinylé 1 µg/mL															
	YscC 42	YscC 43	YscC 45	YscC 46	YscC 47	YscC 50	YscC 58	YscC 62	YscC 63	YscC 65	YscC 66	YscC 67	YscC 68	YscC 69	YscC 70
<i>Y. pestis</i>	0,192	0,678	1,418	0,889	1,100	1,292	1,139	1,274	0,682	0,947	0,930	1,063	1,020	1,024	1,017
<i>E. coli</i>	0,735	1,046	0,719	1,753	1,072	1,426	0,760	0,823	0,842	1,354	0,845	0,532	0,790	1,001	0,665

Anticorps biotinylé 0,1 µg/mL															
	YscC42	YscC43	YscC45	YscC46	YscC47	YscC50	YscC58	YscC62	YscC63	YscC65	YscC66	YscC67	YscC68	YscC69	YscC70
<i>Y. pestis</i>	0,081	0,388	0,511	0,497	0,362	0,893	0,383	1,027	0,281	0,301	0,280	0,232	0,715	0,578	0,381
<i>E. coli</i>	0,741	1,239	0,879	0,966	0,850	0,370	0,658	0,358	0,522	0,872	0,816	0,056	0,657	1,098	0,821

Tableau 11 : Intensité des signaux colorimétriques obtenus (DO_{414 nm}) lors des tests ELISA des AcMs anti-YscC (1 et 0,1 µg/mL) avec *Y. pestis* NC00570 ou *E. coli* BL21 adsorbées sur la phase solide.

5. Tests de réactions croisées avec différentes préparations de protéines recombinantes

Afin de i) tester l'hypothèse d'une contamination de l'immunogène recombinant YscC et confirmer que les AcMs produits avec l'immunogène YscC ne sont pas spécifiques de YscC, et ii) confirmer la spécificité des AcMs anti-YscF et anti-LcrV, en particulier ceux pour lesquels aucun épitope n'avait pu être caractérisé par « épitope mapping », tous les AcMs ont été testés avec différentes préparations biotinylées de protéines recombinantes issues de BL21 (principe du test voir figure 14) :

- un échantillon protéique utilisé lors de l'immunisation contenant la protéine recombinante LcrV, YscF ou YscC,
- un échantillon de protéine recombinante Stx2B partiellement purifiée (Shiga toxine, dont la séquence protéique ne présente aucune identité de séquence protéique avec celles de LcrV, YscF et YscC).

Tous les AcMs anti-LcrV et anti-YscF sont confirmés comme étant spécifiques de leurs échantillons protéiques respectifs utilisés lors de l'immunisation et ne reconnaissent pas l'échantillon partiellement purifié, et probablement contaminé par des antigènes provenant de *E. coli* BL21 (figure 27). A l'inverse, la totalité des AcMs anti-YscC est capable de détecter l'échantillon utilisé pour l'immunisation mais aussi l'échantillon partiellement purifié (figure 27), confirmant la non spécificité des AcMs anti-YscC et indiquant la présence de contaminants dans l'échantillon protéique YscC ayant servi à l'immunisation et identiques à ceux présents dans une préparation partiellement purifiée d'une protéine recombinante préparée de façon identique (purification sur colonne Ni-NTA, à partir de corps d'inclusion de *E. coli* BL21)

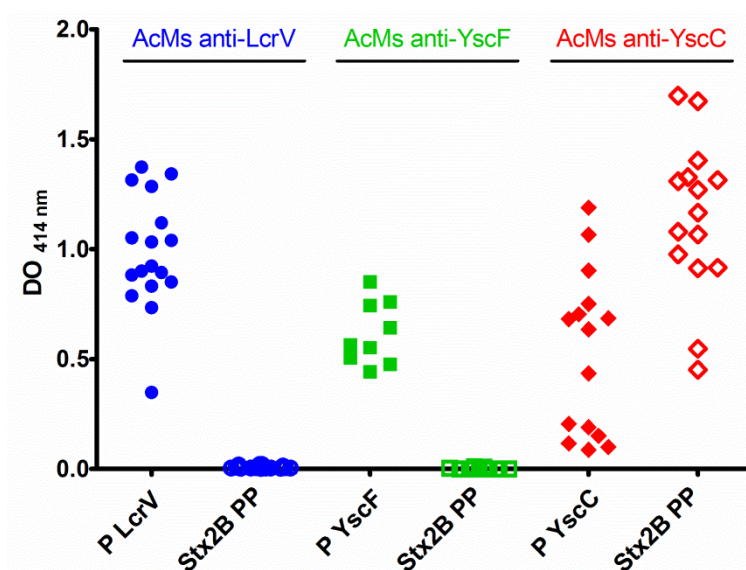


Figure 27 : Tests de réactions croisées sur plaque CAS avec différentes préparations de protéines recombinantes (« P » indiquant l'échantillon protéique utilisé pour l'immunisation et l'échantillon de protéine recombinante et « Stx2B PP » indiquant l'échantillon partiellement purifié de Stx2B) avec les AcMs anti-Lcrv (bleu), anti-YscF (vert) et anti-YscC (rouge). Chaque symbole correspond à un AcM différent. Les AcMs sont utilisés à la concentration de 1 µg/mL et les échantillons protéiques à la concentration de 100 ng/mL.

6. La nouvelle tentative de production d'anticorps monoclonaux anti-YscC

Une nouvelle campagne d'immunisation est réalisée en utilisant un nouvel échantillon de protéine recombinante YscC purifiée par chromatographie d'affinité sur colonne de nickel. 1920 hybridomes sont obtenus. Afin d'éviter les problèmes rencontrés lors de la première campagne d'immunisation, la stratégie de criblage pour la sélection des hybridomes sécrétant des anticorps spécifiques de la protéine YscC est modifiée. Ainsi un double criblage par ELISA est effectué avec une souche *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome (pYV⁺) et une souche de *Y. pseudotuberculosis* I ne produisant pas l'injectisome (pYV⁻). Aucun hybridome ne s'avère spécifique de la bactérie *Y. pestis*, aucun AcM ne peut donc être obtenu.

7. Bilan et discussion

Afin de développer dans un premier temps une sérothérapie contre *Y. pestis* et dans un deuxième temps des tests de diagnostic immunométrique pour la détection du bacille de la peste, il a été décidé de produire un large panel d'AcMs ciblant des protéines de l'injectisome.

Les différentes immunisations réalisées ont permis d'obtenir des AcMs spécifiques des protéines LcrV et YscF. Tous ces AcMs sont capables de reconnaître leur cible sous forme recombinante par immunoblot et par test immuno-enzymatique, mais aussi sous forme native par test immuno-enzymatique utilisant LcrV et YscF de *Y. pestis* produisant l'injectisome.

L'« épitope mapping » des AcMs anti-YscF a permis de définir clairement cinq régions épitopiques reconnues par les anticorps. Tous les anticorps dirigés contre YscF (9) reconnaissent des épitopes linéaires. Il est intéressant de noter que les 3 IgM obtenues reconnaissent toutes le même épitope (région E). De plus, la séquence en acides aminés de ces régions est identique entre *Y. enterocolitica* et *Y. pestis*. Il est donc logique que les AcMs anti-YscF reconnaissent la protéine native du bacille de la peste. En 2013, une publication a décrit cinq peptides de YscF prédits *in silico* comme antigènes (302). Parmi ces peptides, quatre possèdent les séquences des cinq régions que nous avons identifiées avec l'« épitope mapping » de nos AcMs anti-YscF. Lors d'expériences *in vivo* chez la souris, les peptides P1, P2 et P3 (correspondant respectivement à nos régions épitopiques A, C et B) sont décrits comme des épitopes B et apparaissent donc comme des régions immunogéniques importantes. Cependant, le peptide P5 (correspondant à nos régions épitopiques D et E), bien qu'immunogène, ne semble pas antigénique pour les lymphocytes B et T.

L'« épitope mapping » des AcMs anti-LcrV n'a pas permis de définir de régions épitopiques. Il est possible que les 17 AcMs anti-LcrV reconnaissent un épitope conformationnel. Ces AcMs fonctionnent néanmoins en immunoblot. Cependant, cette technique n'est pas complètement dénaturante (par exemple les interactions non covalentes entre les molécules de YscF ne sont pas complètement abolies par le SDS et le chauffage), et il est possible que des anticorps qui fonctionnent en immunoblot ne fonctionnent pas en « épitope mapping ». Une autre possibilité est que les paramètres choisis pour la synthèse des séquences peptidiques (8 acides aminés avec un décalage de 2 acides aminés entre chaque spot) ne permettent pas de révéler de façon optimale les épitopes reconnus par les AcMs. On peut donc aussi envisager l'existence d'épitopes linéaires plus longs pour les AcMs anti-LcrV. Seuls les anticorps polyclonaux présents dans les plasmas des souris immunisées ont révélés la présence de régions plus immunogènes. Cependant, par la présence probable de deux protéines tronquées qui sont reconnues en western blot par tous les AcMs, il semblerait que les régions les plus immunogènes soient présentes dans la partie centrale ou C-terminale de LcrV.

Concernant les AcMs produits contre la protéine YscC, il est apparu rapidement qu'ils ne sont pas spécifiques de celle-ci. Tout d'abord, les tailles de bandes obtenues en western blot sont

différentes de la taille théorique attendue. Lors de l'« épitope mapping », aucun des 15 AcMs ne permet l'obtention d'un signal avec les spots peptidiques parcourant la séquence complète de la protéine YscC. Enfin, la confirmation de la non spécificité est obtenue par ELISA avec la reconnaissance d'une protéine produite dans les mêmes conditions n'ayant pas d'identité de séquence avec YscC et partiellement purifiée, ainsi que la reconnaissance de la souche *E. coli* BL21 utilisée pour la production des protéines recombinantes. Des investigations supplémentaires menées sur les échantillons protéiques utilisés pour l'immunisation des souris indiquent la présence de contaminants dans l'échantillon de protéine recombinante YscC. Ainsi, les AcMs « anti-YscC » sont dirigés contre ces contaminants issus des *E. coli* BL21 utilisées pour la production de protéine recombinante. De plus, la préparation contaminée utilisée lors du criblage des anticorps et donc reconnue par ces AcMs, a pu être biotinylée. Le test ELISA fonctionnant, cela indique une origine protéique de l'antigène contaminant ou au moins une association forte de cet antigène avec une partie protéique.

La sélection des hybridomes réalisée à la suite de l'immunisation YscC repose sur un criblage différentiel. En effet, les hybridomes sont sélectionnés lorsque les signaux obtenus avec la souche *E. coli* BL21 (*yscC*) supposée exprimer la protéine YscC à sa surface sont plus intenses que les signaux obtenus avec la souche *E. coli* BL21. Cependant un signal, même plus faible, a toujours été obtenu avec la souche *E. coli* BL21. La différence de signal entre les deux souches n'indique donc pas une spécificité pour la protéine YscC. Lors de la seconde immunisation avec un nouvel échantillon de protéine recombinante, une nouvelle stratégie de criblage a été mise en place. Le criblage différentiel est directement effectué avec *Y. pestis* exprimant l'injectisome et une *Y. pseudotuberculosis* ne l'exprimant pas. Au final, aucun des hybridomes obtenus ne semble produire des anticorps spécifiques de la protéine YscC.

Il apparaît donc difficile de produire des anticorps contre la protéine native YscC à partir d'une immunisation utilisant la protéine recombinante entière. En effet, YscC est une protéine de grande taille (environ 60 kDa) localisée dans la membrane des *Yersinia* exprimant l'injectisome. La structure de la protéine native n'a été résolue que récemment et il apparaît qu'elle se présente sous forme de dodécamère et seule une petite partie de la protéine est exposée à la surface de la membrane sous forme d'un anneau (figure 28) (303, 304). Les immunisations ont été effectuées avec la protéine entière et il est probable que les hybridomes obtenus ne sécrètent que des anticorps reconnaissant des parties non accessibles de la protéine native dans le cytoplasme ou le périplasme. Si, des anticorps dirigés contre la partie extracellulaire de YscC avaient été produits, il aurait été possible qu'ils ne soient pas sélectionnés lors du criblage, ne pouvant pas accéder à leurs épitopes pour différentes raisons : i) la partie accessible est très limitée, ii) YscC joue un rôle de « plate-forme » pour l'assemblage de l'injectisome (305), et d'autres protéines, comme YscF positionnée directement sur YscC (192) ou les protéines Yops présentes au niveau de la membrane (306), pourraient empêcher l'accès d'éventuels anticorps spécifiques, iii) la présence des lipopolysaccharides (LPS) chez *Y. pestis* pourrait également gêner l'accès des anticorps à leurs épitopes.

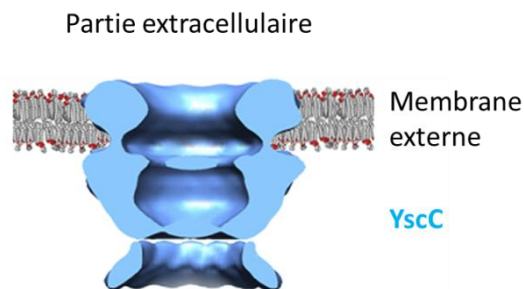


Figure 28 : Structure de YscC. D'après (303).

En conclusion, nous avons obtenu deux séries de 17 et 9 AcMs spécifiques de deux protéines de l'injectisome des *Yersinia* : LcrV et YscF qu'il reste à caractériser.

II. Les analyses combinatoires

Une analyse combinatoire (principe du test voir figure 16A et 16 B) pour chacune des séries d'AcMs LcrV et YscF a été menée afin d'évaluer la capacité de liaison de chacun des types d'anticorps aux protéines recombinantes et natives correspondantes et d'identifier les différents groupes de compatibilité, c'est-à-dire les paires d'AcMs capables de se lier simultanément à une même cible. A l'inverse, cette analyse permet de définir les groupes d'AcMs qui ne sont pas compatibles entre eux, et donc reconnaissent la même région épitopique. Ce test consiste à utiliser chaque AcM en tant qu'AcM de capture ou AcM traceur après couplage à la biotine. Différentes concentrations de protéines recombinantes sont utilisées afin d'identifier les meilleurs AcMs.

1. Les analyses combinatoires des anticorps monoclonaux anti-LcrV

L'analyse combinatoire des anticorps monoclonaux anti-LcrV avec la protéine recombinante

Tous les AcMs utilisés en capture ou en traceurs sont capables de se lier à la protéine recombinante LcrV. Sur les 289 combinaisons testées avec les AcMs anti-LcrV, 254 présentent une compatibilité entre les AcMs utilisés et permettent la détection de la protéine recombinante utilisée à forte concentration (100 ng/mL, tableau 12A), mais seulement 127 combinaisons la détectent encore à plus faible concentration (10 ng/mL, tableau 12B). Néanmoins, l'intensité des signaux optiques est fortement diminuée pour la plupart des combinaisons reconnaissant la protéine recombinante à faible concentration.

A forte concentration de protéine recombinante, certaines combinaisons contenant un même AcM en capture et en traceur peuvent détecter la protéine recombinante (LcrV4, 5, 11, 12, 14, 21, 22, 27 et 31). Il apparaît que l'AcM LcrV17 présente peu d'affinité dans ce format de test

immunométrique car il ne fonctionne qu'en tant qu'anticorps de capture et ne donne qu'un signal faible. Certaines combinaisons présentent le même profil de détection de la protéine recombinante, donnant une indication sur les groupes de compatibilité : un premier groupe avec LcrV2, 22, 31 ; un deuxième groupe avec LcrV5, 26, 27 ; un troisième groupe avec LcrV14, 16 ; un quatrième groupe avec LcrV4, 11, 12 ; un cinquième groupe avec LcrV1, 3, 21, 24 ; et les AcMs LcrV17 et LcrV20 seuls.

L'analyse combinatoire des anticorps monoclonaux anti-LcrV avec la protéine native

L'analyse combinatoire des AcMs anti-LcrV est effectuée avec la bactérie *Y. pestis* NC00570 à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Ce sont 53 combinaisons d'AcMs qui présentent une compatibilité entre les AcMs utilisés pour reconnaître la protéine native LcrV présente à la surface de la bactérie (tableau 12C).

Parmi ces 53 combinaisons, toutes sont aussi capables de détecter la protéine native avec pour la plupart une très bonne affinité (33 combinaisons présentent une $DO_{414\text{ nm}} > 0,4$ sur le tableau 12A et 44 combinaisons détectent la protéine recombinante à 10 ng/mL sur le tableau 12B).

Enfin, il apparaît que certains AcMs sont majoritairement retrouvés dans les combinaisons qui fonctionnent le mieux (LcrV3, 5, 11, 14, 21, 22, 24, 26 et 27).

A

		Anticorps traceur																	
		LerV 1	LerV 2	LerV 3	LerV 4	LerV 5	LerV 11	LerV 12	LerV 14	LerV 16	LerV 17	LerV 20	LerV 21	LerV 22	LerV 24	LerV 26	LerV 27	LerV 31	
Anticorps de capture	LerV 1																		
	LerV 2																		
	LerV 3																		
	LerV 4																		
	LerV 5																		
	LerV 11																		
	LerV 12																		
	LerV 14																		
	LerV 16																		
	LerV 17																		
	LerV 20																		
	LerV 21																		
	LerV 22																		
	LerV 24																		
	LerV 26																		
	LerV 27																		
	LerV 31																		

</

Tableau 12 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-LcrV. (A) Avec la protéine recombinante LcrV utilisée à la concentration de 100 ng/mL. (B) Avec la protéine recombinante LcrV utilisée à la concentration de 10 ng/mL. (C) Avec *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome. Les cases blanches correspondent aux AcMs donnant un signal inférieur à la limite de détection (environ trois fois le signal moyen du bruit de fond), c'est à dire aux AcMs non compatibles. Cases jaunes : $DO_{414\text{ nm}} < 0,1$; cases oranges : $0,1 < DO_{414\text{ nm}} < 0,4$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,4$.

2. Les analyses combinatoires des anticorps monoclonaux anti-YscF

L'analyse combinatoire des anticorps monoclonaux anti-YscF avec la protéine recombinante

La protéine YscF étant capable d'oligomériser (résultats du western blot et (275, 301)), les analyses combinatoires ne peuvent que donner des informations sur l'affinité et la sensibilité des combinaisons d'AcMs, et non sur leur compatibilité (un même épitope étant présent au moins deux fois). Ainsi, tous les AcMs anti-YscF utilisés en capture ou en traceur sont capables de se lier à la protéine recombinante YscF de façon compatible. Sur les 81 combinaisons testées, 60 permettent la détection de la protéine recombinante utilisée à forte concentration (50 ng/mL, tableau 13A) et 35 combinaisons peuvent toujours la détecter à faible concentration (10 ng/mL, tableau 13B). Cependant, les signaux optiques de ces combinaisons détectant une faible concentration restent élevés, indiquant une bonne sensibilité de ces paires d'AcMs.

L'analyse combinatoire des anticorps monoclonaux anti-YscF avec la protéine native

Les résultats obtenus lors de cette analyse combinatoire ne sont pas exploitables car un très fort bruit de fond était présent à la lecture de l'absorbance.

		Anticorps traceur								
		YscF	YscF	YscF	YscF	YscF	YscF	YscF	YscF	YscF
		1	2	11	12	13	14	15	16	17
Anticorps de capture	YscF 1									
	YscF 2									
	YscF 11									
	YscF 12									
	YscF 13									
	YscF 14									
	YscF 15									
	YscF 16									
	YscF 17									
	YscF 18									
Anticorps de capture	YscF 1									
	YscF 2									
	YscF 11									
	YscF 12									
	YscF 13									
	YscF 14									
	YscF 15									
	YscF 16									
	YscF 17									
	YscF 18									

Tableau 13 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps anti-YscF. (A) Avec la protéine recombinante YscF utilisée à la concentration de 50 ng/mL. (B) Avec la protéine recombinante YscF utilisée à la concentration de 10 ng/mL. Les cases blanches correspondent aux AcMs donnant un signal inférieur à la limite de détection (environ trois fois le signal moyen du bruit de fond). Cases jaunes : $DO_{414\text{ nm}} < 0,2$; cases oranges : $0,2 < DO_{414\text{ nm}} < 0,4$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,4$.

3. Bilan et discussion

Les analyses combinatoires nous ont servis à évaluer la capacité de liaison de chacun des types d'anticorps aux protéines recombinantes et natives permettant la sélection des AcMs utilisables pour la sérothérapie et les tests de diagnostic immunométriques.

Dans les séries d'AcMs anti-LcrV et anti-YscF, une grande majorité d'AcMs utilisés en combinaison sont capables de détecter la protéine recombinante à différentes concentrations. Cependant, les combinaisons constituées avec les AcMs reconnaissant le même épitope (AcM identique ou AcMs du même groupe de compatibilité) ne devraient pas reconnaître la protéine recombinante. C'est pourtant le cas à une concentration élevée de LcrV pour certaines combinaisons. Deux hypothèses peuvent être tirées de ces résultats : notre protéine recombinante LcrV oligomérisise à forte concentration ce qui permet à certaines combinaisons d'AcMs à priori non compatibles de la détecter ou les groupes d'AcMs anti-LcrV définis ne sont pas exactes.

Concernant YscF, il est tout à fait normal que certaines combinaisons formées d'un même AcM ou de deux AcMs reconnaissant le même épitope puissent détecter la protéine recombinante car nous avons pu voir par immunoblot que notre préparation contient de la protéine oligomérisée. Ainsi l'analyse combinatoire des AcMs anti-YscF ne permet pas de définir les groupes de compatibilité. Cependant, ceux-ci peuvent être déduits grâce à l'« épitope mapping » qui a permis de préciser les régions épitopiques.

Enfin, le nombre de combinaisons d'AcMs détectant la protéine native LcrV semble plus réduit. Cependant, cette analyse combinatoire n'a été effectuée qu'avec la protéine native présente sur la bactérie testée et pas le surnageant de culture, dans lequel une grande quantité de LcrV est sécrétée (276). Il est donc probable qu'une grande partie de cette protéine ne soit pas détectée car présente majoritairement dans le surnageant de culture.

III. La sérothérapie

Dans un premier temps, nous avons tenté de développer des tests *in vitro* afin de sélectionner des AcMs ayant une activité neutralisante contre le bacille de la peste et ainsi réduire le nombre d'animaux à utiliser lors des expériences *in vivo*.

1. Les tests *in vitro* de neutralisation de *Y. pestis* par les anticorps monoclonaux

Les tests *in vitro* de neutralisation sont basés sur la détection de la cytotoxicité (LDH) ou de la viabilité (ATP) des cellules en culture (cellules épithéliales humaines HeLa ou un mélange de monocytes et de macrophage murins J774A.1).

1.1. La mise au point

Certains paramètres du test de détection de la cytotoxicité (activité lactate déshydrogénase LDH) doivent être préalablement mis au point. Ainsi, après plusieurs tests de différentes concentrations cellulaires, la concentration de 10^5 cellules/puits est sélectionnée car elle permet d'obtenir un écart maximal entre le signal donné par l'activité LDH basale des cellules et le signal correspondant à l'activité maximale lors de la lyse de ces cellules (figure 29).

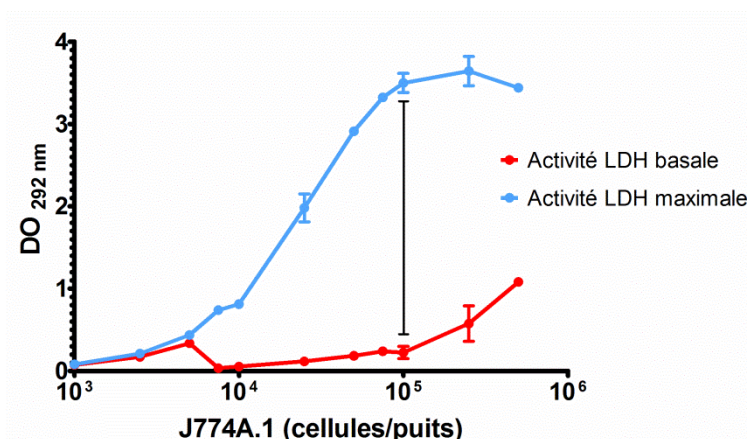


Figure 29 : Détermination de la concentration optimale de cellules J774A.1 par puits.

1.2. La réalisation

Lors des tests de mesure de la cytotoxicité ou mesure de la viabilité, la caractérisation d'un effet protecteur pour les 17 AcMs anti-LcrV et les 9 AcMs anti-YscF testés sur les cellules HeLa et J774A.1 infectées n'a pu être réalisée. En effet, la cytotoxicité (ou la viabilité cellulaire, résultats non montrés) mesurée lors d'infections avec *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* est très variable entre les différentes expérimentations. Cette même variabilité est retrouvée sur les mesures réalisées lors d'infections avec les mêmes bactéries incubées préalablement avec les AcMs (seuls ou en combinaison) et aucun effet des AcMs n'a pu être déterminé (figure 30).

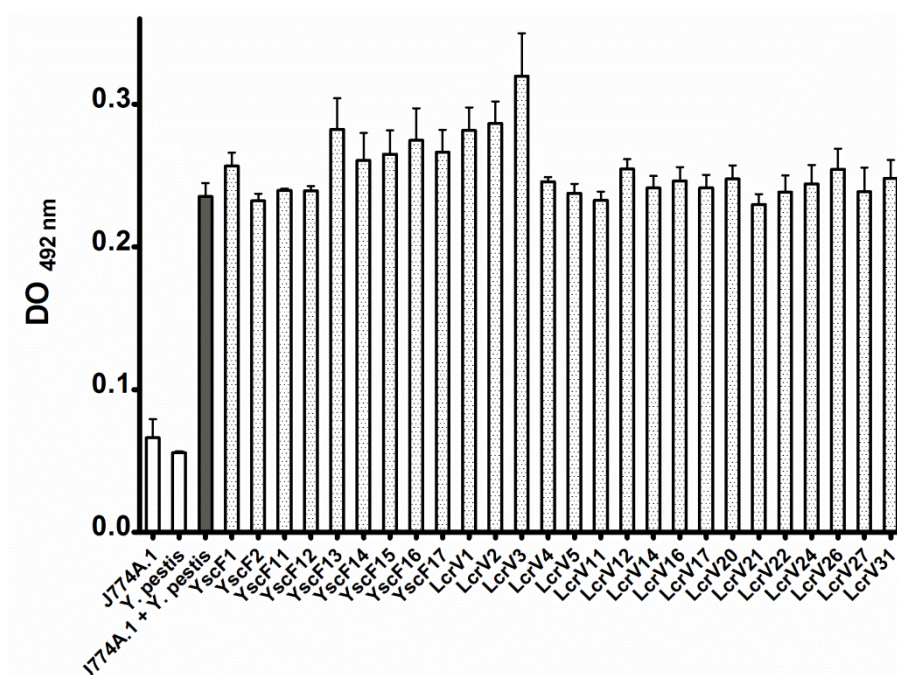


Figure 30 : Activité LDH indiquant la cytotoxicité, dans le surnageant de culture de cellules J774A.1 seules, de *Y. pestis* NC00570 seules ou lors d'infections réalisées en triplicats en présence ou non des anticorps monoclonaux anti-YscF et anti-LcrV utilisés seuls. Concentrations de 10^5 cellules J774A.1/puits et de 10^6 cfu *Y. pestis*/puits. Les bactéries sont incubées avec 10 µg/ml d'anticorps durant 30 min avant l'infection. La mesure est réalisée après 3 h d'infection.

2. Les tests *in vivo* de protection avec les anticorps monoclonaux

Afin d'identifier les AcMs ayant un potentiel thérapeutique contre le bacille de la peste, les AcMs anti-LcrV et anti-YscF précédemment caractérisés pour leur bonne reconnaissance de leurs cibles sont testés dans un modèle murin de peste bubonique par l'Unité de Recherche *Yersinia* à l'Institut Pasteur de Paris.

2.1. Les anticorps monoclonaux anti-LcrV

Le choix des anticorps monoclonaux à tester

Les analyses combinatoires de ces AcMs avec la protéine native (principe du test voir figure 16B) permettent d'identifier les AcMs offrant les meilleures affinités en tant qu'anticorps de capture ou anticorps traceur. Ce sont donc les AcMs LcrV3, 5, 11, 14, 21, 24, 26 et 27 qui sont choisis. Afin de réduire le nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations *in vivo* et mais néanmoins tester de nombreux anticorps, il a été décidé d'utiliser les AcMs anti-LcrV par paires.

Les résultats

Six paires d'AcMs n'ont pas donné de diminution de la mortalité des animaux infectés. En revanche, la paire LcrV21+LcrV24 a permis, au cours de la première expérience, la survie d'environ

40% des animaux. Cette paire LcrV21+LcrV24 a ensuite été re-testée quatre fois indépendamment afin de vérifier la solidité de cet effet thérapeutique. Bien qu'un effet significatif soit détectable en cumulant les 5 expériences portant sur un total de 34 souris ($p=0,026$; figure 31), cet effet thérapeutique n'est pas systématiquement observé dans chaque expérience, ce qui suggère que l'efficacité thérapeutique de cette paire d'AcMs reste limitée.

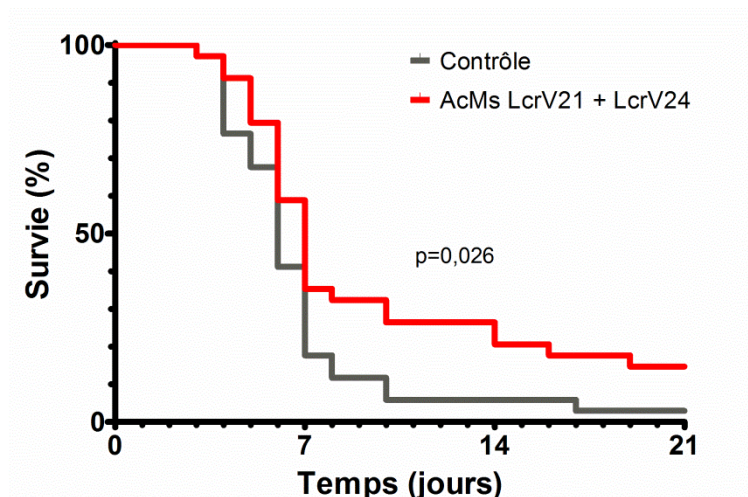


Figure 31 : Courbe de survie des souris après infection avec *Y. pestis* CO92 et non traitées (-) ou traitées (-) avec les anticorps monoclonaux LcrV21+LcrV24. 34 souris par condition. La valeur-p indiquée est obtenue par comparaison des courbes de survie avec le test du Log-rank de Mantel-Cox.

2.2. Les anticorps monoclonaux anti-YscF

Le choix des anticorps monoclonaux à tester

Les expériences d'« épitope mapping » ont permis de préciser les épitopes de la protéine YscF reconnus (de A à E) et de définir les différentes incompatibilités existantes entre les AcMs anti-YscF. Ainsi, un AcM du type IgM (contre l'épitope E) est testé seul : c'est YscF17 qui est choisi car les signaux optiques obtenus lors des analyses combinatoires sur la protéine recombinante sont plus élevés qu'avec YscF11 ou YscF14. Puis afin de réduire le nombre d'animaux utilisés lors des expérimentations *in vivo*, les AcMs du type IgG, reconnaissant des régions épitopiques distinctes et compatibles (donc assez distantes) : YscF2 (A) + YscF15 (B) et YscF13 (C) + YscF1 (D), sont testés par paires.

Les résultats

Les paires d'AcMs de type IgG n'ont ni diminué, ni retardé la mortalité des animaux, ce qui suggère une absence d'efficacité thérapeutique. En revanche lors d'une première expérience, un retard de mortalité de 3 jours a été observé avec l'AcM de type IgM YscF17. Afin de confirmer cette observation, l'expérience a été répétée avec une nouvelle préparation de YscF17 et le résultat a été compilé avec le précédent de façon à augmenter leur force statistique. Au final, aucune différence

significative de survie entre les souris témoins et les contrôles n'est obtenue (figure 32). Les AcMs YscF, seuls ou en association, ne semblent donc pas protéger contre la peste bubonique.

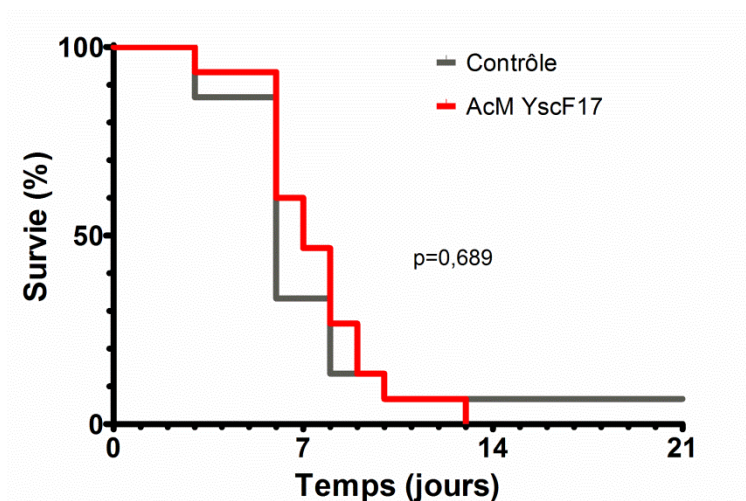


Figure 32 : Courbe de survie des souris après infection avec *Y. pestis* CO92 et non traitées (-) ou traitées (-) avec l'anticorps monoclonal YscF17. 15 souris par condition. Valeur-p indiquée obtenue par comparaison des courbes de survie avec le test du Log-rank de Mantel-Cox.

3. Bilan et discussion

Lors des tests *in vitro*, les expériences réalisées n'ont pas permis d'observer un effet de protection lors de l'infection des cellules par les bactéries du genre *Yersinia* avec des AcMs anti-LcrV ou anti-YscF. Le test choisi pour réaliser ce criblage *in vitro* des AcMs semblait pourtant pertinent car il est décrit dans la littérature des anticorps monoclonaux murins ayant protégé des cellules J774A.1 lors de tests *in vitro* identiques et qui ont par la suite prouvé leur efficacité thérapeutique *in vivo* (277, 278, 307). Cependant, la variabilité des résultats obtenus n'a pu être résolue et l'absence d'un témoin positif (anticorps neutralisant ayant prouvé son effet *in vitro*) ne permet pas de conclure sur l'effet *in vitro* de nos AcMs. Les résultats obtenus *in vivo* par la suite pour certains de ces anticorps suggèrent plutôt un problème d'efficacité des anticorps qu'un problème de réalisation des tests.

A l'aide des analyses combinatoires pour les AcMs anti-LcrV et de la caractérisation des épitopes pour les AcMs anti-YscF, certains ont été sélectionnés afin d'être évalués *in vivo* dans un modèle de peste bubonique. Pour les AcMs anti-LcrV, il apparaît finalement qu'une seule paire (LcrV21+LcrV24) donne une légère protection significative. Cependant, cette protection est insuffisante pour envisager le développement d'un protocole thérapeutique. Pour les AcMs anti-YscF, aucun ne semble protéger les souris contre la peste bubonique. Seul l'AcM YscF17 a permis dans une seule expérience, un léger retard dans la mort des souris. Cependant, cet effet n'est pas reproductible.

Certaines régions de la protéine LcrV sont importantes pour l'action neutralisante des AcMs (308). Ainsi, l'acide aminé N225 est un acide aminé clé dans la reconnaissance d'un AcM protecteur (309), mais lors de notre « épitope mapping » réalisé avec les saignées et les AcMs anti-LcrV, aucun signal n'a été obtenu sur les spots possédant ce N225. La séquence en acides aminés 196-225 est

également décrite comme un épitope protecteur contre l'infection à *Y. pestis* (280). L'« épitope mapping » réalisé avec les saignées a révélé un spot compris dans cette séquence (séquence en acides aminés 201-208 YTDEEIFK sur la figure 24A et 25A, Biozzi n°1 spot E5). Cependant avec nos différents AcMs, aucun signal n'a été obtenu sur ce même spot.

Il est à présent envisagé de combiner les seuls AcMs ayant donné au moins un effet même limité (LcrV21+LcrV24+YscF17) pour une nouvelle tentative. De plus, le laboratoire dispose d'un AcM anti-Pla qui a été testé *in vivo* dans les mêmes conditions et qui a provoqué (de façon non reproductible) un retard de mortalité. Un AcM ciblant une autre protéine impliquée dans la virulence dans la combinaison peut donc être envisagé. En effet, il est possible qu'une association puisse augmenter les effets des AcMs (269) et favoriser l'opsonisation des bactéries.

Un test *in vitro* pour caractériser les AcMs qui n'ont pas été évalués *in vivo* serait un outil intéressant pour compléter ce travail.

IV. Les tests de diagnostic immunométriques

La méthode de référence pour le diagnostic de la peste est historiquement l'isolement par culture. Néanmoins, cette technique reste longue au regard de la rapidité de la maladie. Des techniques plus rapides ont par la suite été développées, en particulier basées sur l'immuno-détection de l'antigène F1 (tests immuno-enzymatiques de type ELISA ou tests immuno-chromatographiques de type bandelettes) (166). Ces tests peuvent présenter des limitations, en particulier pour les souches dépourvues de l'antigène F1 et cependant virulentes. Il a été montré que LcrV, essentiel à la virulence de *Y. pestis*, pouvait être détecté de façon précoce dans le sérum (peste bubonique) ou dans les poumons (peste pulmonaire) de souris infectées (310). Nous nous proposons donc d'évaluer la pertinence de l'utilisation des anticorps anti-LcrV mais aussi anti-YscF précédemment produits pour le diagnostic de la peste dans différents fluides et échantillons biologiques.

1. Les tests immuno-enzymatiques EIA

1.1. L'optimisation du dosage immunométrique à deux sites (EIA)

Choix des traceurs couplés à l'acétylcholinestérase

Les analyses combinatoires ont été précédemment réalisées avec des anticorps traceurs biotinylés. D'expérience, la plupart des anticorps couplés à l'AChE utilisés comme traceurs permettent de réduire le signal non spécifique, et/ou d'augmenter le signal spécifique, et de supprimer une étape du protocole. La réalisation d'un traceur avec l'AChE est relativement longue et coûteuse. Elle ne peut s'effectuer sur un grand nombre d'anticorps. Il est donc nécessaire de sélectionner un ou deux

anticorps, présentant les meilleures qualités sous sa forme biotinylée, et dont l'isotype est adéquat, pour réaliser ce couplage.

Dans un premier temps, les AcMs sont choisis pour leur appartenance à l'isotype IgG1, ce qui est préférable pour la réalisation du couplage de l'anticorps à l'AChE. Le protocole qui est utilisé pour cet isotype particulier nous permet d'obtenir des traceurs sous forme de F(ab') qui ne donnent généralement peu ou pas de bruit de fond lors de leur utilisation dans des tests immuno-enzymatiques.

Ainsi pour les AcMs anti-LcrV, le choix du traceur à coupler à l'AChE se porte sur LcrV5 qui fait également preuve d'une bonne sensibilité. En effet, lors des analyses combinatoires avec la protéine recombinante, cet AcM est compatible avec tous les autres AcMs anti-LcrV (sauf LcrV17) aux deux concentrations protéiques testées (100 et 10 ng/mL). Lors des analyses combinatoires avec la protéine native, cet AcM est capable de la détecter en combinaison avec 9 autres AcMs anti-LcrV (LcrV3, 4, 12, 16, 14, 21, 22, 24 et 31). Enfin, cet AcM utilisé en traceur permet d'obtenir des signaux optiques forts.

Concernant les AcMs anti-YscF, le choix du traceur à coupler à l'AChE se porte sur YscF15 qui fait preuve d'une bonne sensibilité lors des analyses combinatoires avec la protéine recombinante en comparaison avec les autres AcMs d'isotype IgG1 (YscF2, 12, 13 et 16). En effet, il est compatible avec les 7 AcMs anti-YscF lorsque la concentration de protéine recombinante est de 50 ng/mL et il permet toujours la détection de celle-ci à une concentration de 10 ng/mL en combinaison avec 6 AcMs anti-YscF (YscF2, 11, 12, 13, 14 et 17).

La détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE

L'optimisation du test EIA (dosage sandwich) nécessite de définir une concentration d'utilisation de l'AcM traceur. Pour cela, le dosage sandwich est réalisé avec différentes concentrations des traceurs LcrV5-AChE et YscF15-AChE en association respective avec les AcMs de capture LcrV21 et YscF12, (combinaisons qui permettaient une bonne reconnaissance des protéines cibles lors des analyses combinatoires) afin de détecter leur protéine recombinante. La concentration retenue est celle donnant le meilleur ratio entre le signal obtenu avec la protéine recombinante et le signal du bruit de fond.

La concentration optimale d'utilisation est de 5 UE/mL finale pour LcrV5-AChE (figure 33A) et de 2 UE/mL finale pour YscF-15AChE (figure 33B).

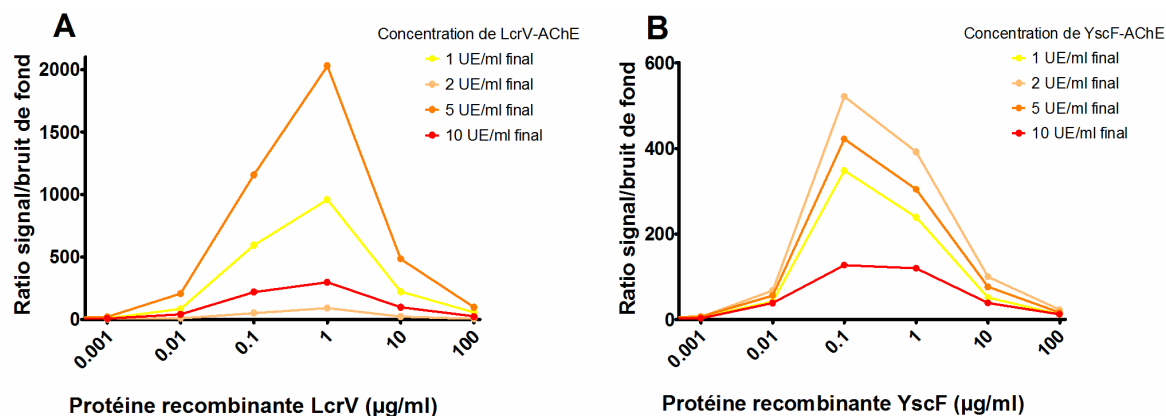


Figure 33 : Détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE. (A) Dosage sandwich LcrV21/LcrV5-AChE avec la protéine recombinante LcrV. (B) Dosage sandwich YscF12/YscF15-AChE avec la protéine recombinante YscF.

La recherche du meilleur anticorps monoclonal de capture

Afin d'optimiser notre test EIA, il est nécessaire de définir l'AcM de capture permettant d'obtenir la meilleure sensibilité. Des dosages sandwich sont donc effectués avec les traceurs LcrV5-AChE ou YscF15-AChE aux concentrations optimales définies (5 et 2 UE/mL), avec tous les AcMs de capture anti-LcrV ou anti-YscF et avec des dilutions en série des protéines recombinantes.

Une première expérience permet la sélection des AcMs de capture donnant un signal fort et une bonne sensibilité : LcrV1, 21, 22 et 31 ; YscF2, 11 et 13.

Après confirmation par une deuxième expérience, le meilleur AcM de capture est sélectionné. Ainsi, en association avec le traceur LcrV5-AChE, c'est l'AcM de capture LcrV22 qui permet d'obtenir la meilleure sensibilité avec un signal fort et un bruit de fond faible (figure 34A et tableau 14A). L'intensité du signal obtenue avec ce traceur est peu différente de celle obtenue avec l'AcM LcrV13, mais le bruit de fond est moins important avec LcrV21. Pour le traceur YscF15-AChE, c'est l'AcM YscF11 qui remplit au mieux la fonction d'anticorps de capture, son bruit de fond étant plus faible que celui obtenu avec YscF2 et 13 (figure 34B et tableau 14B).

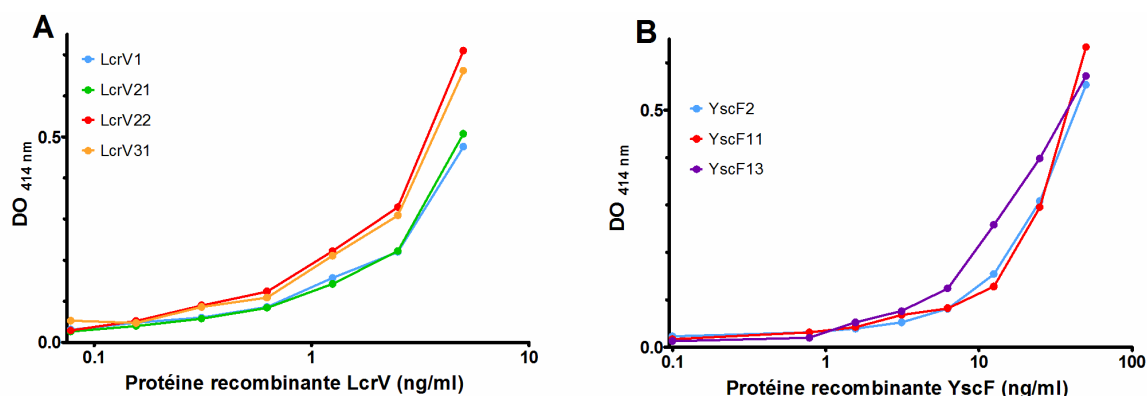


Figure 34 : Détermination de l'anticorps de capture. (A) Dosage sandwich du traceur LcrV5-AChE avec la protéine recombinante LcrV. (B) Dosage sandwich du traceur YscF15-AChE avec la protéine recombinante YscF.

A

LcrV recombinant LcrV5-AChE	Anticorps de capture			
	LcrV1	LcrV21	LcrV22	LcrV31
12,5 ng/mL	6,5	10,1	15,9	7,3
6,25 ng/mL	3,6	6,0	8,9	3,8
3,1 ng/mL	2,5	4,1	6,4	3,0
1,5 ng/mL	2,0	2,9	3,7	1,6
0,8 ng/mL	1,3	1,9	2,1	1,8
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0

B

YscF recombinant YscF15-AChE	Anticorps de capture		
	YscF2	YscF11	YscF13
12,5 ng/mL	6,7	19,8	7,5
6,25 ng/mL	3,5	9,5	4,8
3,1 ng/mL	2,3	5,8	4,0
1,5 ng/mL	1,7	4,0	2,5
0,8 ng/mL	1,3	1,8	1,5
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0

Tableau 14 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série. (A) ELISA sandwich avec le traceur LcrV5-AChE. (B) ELISA sandwich avec le traceur YscF15-AChE.

La limite de détection (LoD) des protéines recombinantes LcrV et YscF est calculée comme étant la concentration produisant un signal correspondant à la moyenne du signal non spécifique additionnée de trois fois la déviation standard de cette moyenne. Pour l'EIA LcrV utilisant la combinaison LcrV22/LcrV5-AChE, la LoD correspond à 42 mDO et se situe donc à environ 0,08 ng/mL (39 mDO) soit 2,1 pM. Concernant l'EIA YscF utilisant la combinaison YscF11/YscF15-AChE, la LoD correspond à 51 mDO et est donc proche de 3,1 ng/mL (68 mDO) soit 443 pM.

1.2. La détection des protéines recombinantes par ajout dans des matrices biologiques

Les deux EIA précédemment développés et optimisés sont évalués avec des matrices biologiques d'urine et de plasma murins plus ou moins diluées et auxquelles sont ajoutées les protéines recombinantes LcrV ou YscF. En effet, il semble intéressant de tester ces deux matrices biologiques, car les deux protéines peuvent y être sécrétées et détectées. Ainsi, ces protéines recombinantes sont utilisées à différentes concentrations dans de l'urine et du plasma purs ou dilués dans du tampon EIA. Les sensibilités des EIAs effectués à partir de matrices biologiques pures puis diluées en tampon EIA sont comparées avec les EIAs effectués avec du tampon EIA.

Deux temps d'incubations sont également évalués (2 h ou 18 h) avec la protéine recombinante LcrV. Il apparaît qu'avec un temps d'incubation de 18 h, des signaux plus intenses sont obtenus et l'EIA permet une détection plus sensible des protéines recombinantes dans l'urine et le plasma (figure 35)

Les deux matrices urine ou plasma ont un effet inhibiteur pour les deux EIAs. Pour l'EIA LcrV, plus les matrices urine ou plasma sont diluées en tampon EIA, plus l'intensité des signaux augmente et plus le bruit de fond diminue (figure 35C et 35D). De plus, la matrice « urine pure » semble totalement inhiber la détection de la protéine LcrV et de la protéine YscF (figure 35C et 36A). Enfin, de façon surprenante, l'EIA YscF avec la matrice plasma rend compte d'une augmentation de l'intensité des signaux en présence de plasma (figure 36B). Plus le plasma est dilué, plus l'intensité du signal est élevée. Il semble cependant que ce résultat soit peu probable et reste à confirmer.

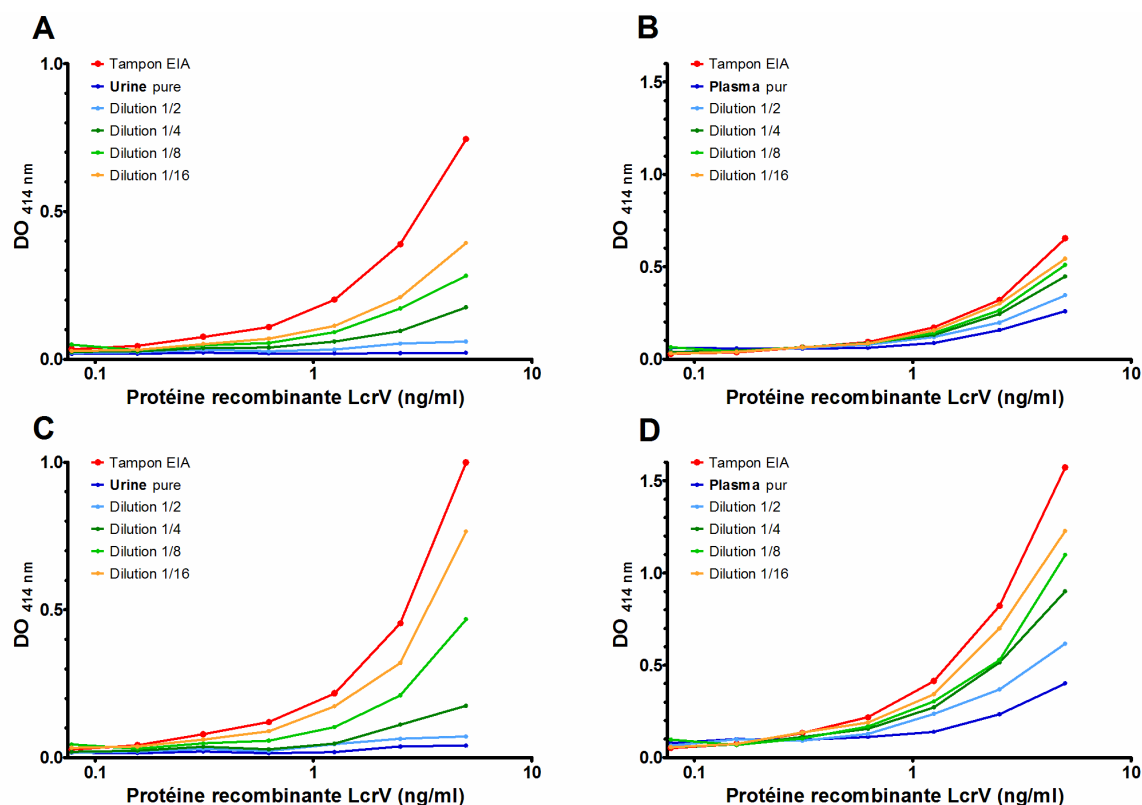


Figure 35 : EIA pour la détection de la protéine recombinante LcrV dans différentes matrices. (A) EIA LcrV avec la matrice urine. Incubation 2 h. (B) EIA LcrV avec la matrice plasma. Incubation 2 h. (C) EIA LcrV avec la matrice urine. Incubation 18 h. (D) EIA LcrV avec la matrice plasma. Incubation 18 h.

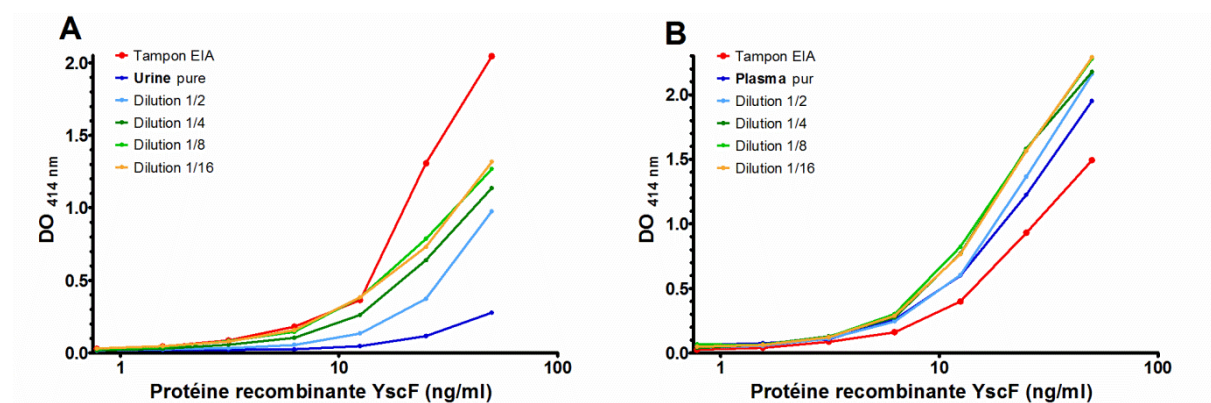


Figure 36 : EIA pour la détection de la protéine recombinante YscF dans différentes matrices. (A) EIA YscF avec la matrice urine. Incubation 18 h. (B) EIA YscF avec la matrice plasma. Incubation 18 h.

Les différentes LoDs obtenues sont indiquées dans le tableau 15. Pour l'EIA LcrV, les LoDs sont de l'ordre de 0,6 ng/mL dans l'urine diluée au 1/8 (le test est donc capable de détecter 4,8 ng/ml dans l'urine pure soit 126 pM), et de 2,5 ng/mL dans le plasma pur soit 66 pM. Pour l'EIA YscF, la LoD est de l'ordre de 1,6 ng/mL dans l'urine diluée au 1/4 (le test est donc capable de détecter 6,4 ng/ml dans l'urine pure soit 914 pM). Dans le plasma pur, la LoD atteint 6,25 ng/mL, soit 893 pM.

Pour l'EIA LcrV, il apparait que les LoDs sont beaucoup plus élevées dans les matrices biologiques (0,08 ng/mL dans le tampon EIA). L'urine semble avoir un effet inhibiteur puisque la protéine recombinante LcrV n'est détectable que dans les échantillons dilués au 1/4 au minimum. Au contraire, le plasma ne semble pas avoir d'effet inhibiteur puisque, en tenant compte du facteur de dilution, les LoDs sont identiques dans le plasma pur ou dilué.

Concernant l'EIA YscF, les LoDs sont proches de celle trouvée dans le tampon EIA (3,1 ng/mL). Cependant, l'urine et le plasma ne semblent pas avoir un effet inhibiteur trop fort car en tenant compte du facteur de dilution, les LoDs sont semblables dans les deux matrices, qu'elles soient pures ou diluées.

Matrice	EIA LcrV	EIA YscF
Tampon EIA	0,08 - 0,16	1,6 - 3,1
Urine pure	-	12,5
Urine 1/2	-	6,25
Urine 1/4	1,25	1,6
Urine 1/8	0,6	1,6
Urine 1/16	0,3	1,6
Plasma pur	2,5	6,25
Plasma 1/2	1,25	3,1
Plasma 1/4	0,6	1,6
Plasma 1/8	0,6	0,8
Plasma 1/16	0,3	3,1

Tableau 15 : Limites de détection en ng/mL dans différentes matrices de l'EIA LcrV pour la détection de la protéine recombinante LcrV, et de l'EIA YscF pour la détection de la protéine recombinante YscF

2. Les tests immuno-chromatographiques

2.1. Les analyses combinatoires en bandelettes

Les analyses combinatoires en bandelettes des anticorps monoclonaux anti-LcrV

Dans le but de mettre au point un test de diagnostic rapide de la peste dans les fluides biologiques, et pour des raisons de simplicité, un test bandelette est également développé, demandant moins d'expertise, et plus facilement transférable, mais généralement moins sensible. Une analyse combinatoire est donc réalisée afin de tester toutes les combinaisons anticorps capture/anticorps traceur couplé à l'or colloïdal des tests immuno-chromatographiques (bandelettes). L'analyse

combinatoire est réalisée avec la bactérie *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome aux concentrations de 5×10^7 et de 5×10^6 cfu/ml et le surnageant de culture BHI après centrifugation et élimination des bactéries.

Sur 289 combinaisons en bandelettes testées, 112 permettent de détecter la protéine native LcrV sur les bactéries *Y. pestis* et dans les surnageants de culture (tableau 16). 17 combinaisons permettent de détecter LcrV avec une meilleure sensibilité (en vert foncé dans le tableau 16).

		Anticorps traceur																	
		LcrV 1	LcrV 2	LcrV 3	LcrV 4	LcrV 5	LcrV 11	LcrV 12	LcrV 14	LcrV 16	LcrV 17	LcrV 20	LcrV 21	LcrV 22	LcrV 24	LcrV 26	LcrV 27	LcrV 31	
Anticorps de capture	LcrV 1																		
	LcrV 2																		
	LcrV 3																		
	LcrV 4																		
	LcrV 5																		
	LcrV 11																		
	LcrV 12																		
	LcrV 14																		
	LcrV 16																		
	LcrV 17																		
	LcrV 20																		
	LcrV 21																		
	LcrV 22																		
	LcrV 24																		
	LcrV 26																		
	LcrV 27																		
	LcrV 31																		

Tableau 16 : Résultats de l'analyse combinatoire bandelettes des anticorps anti-LcrV avec *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome et le surnageant de culture des mêmes bactéries. Cases vertes claires : bandelettes positives pour la détection de LcrV avec 5×10^7 cfu/mL et dans le surnageant de culture ; cases vertes foncées : bandelettes positives pour la détection de LcrV avec 5×10^6 cfu/mL et dans le surnageant de culture.

Ces 17 combinaisons sont sélectionnées pour effectuer des tests supplémentaires pour la détection de la protéine recombinante LcrV afin de pouvoir quantifier la sensibilité des tests. Si toutes ces combinaisons la détectent (figure 37A), seulement 3 (LcrV5/LcrV1*, LcrV26/LcrV16* et LcrV27/LcrV21*) sont assez sensibles pour détecter la protéine recombinante à la concentration de 0,1 ng/mL soit 2,7 pM ou 0,01 ng/bandelette. Le signal colorimétrique le plus intense est obtenu avec la bandelette comportant l'AcM de capture LcrV26 en combinaison avec l'AcM traceur LcrV16* (figure 37B).

A

	Anticorps de capture/Anticorps traceur																
	LcrV3 LcrV4*	LcrV5 LcrV1*	LcrV5 LcrV3*	LcrV5 LcrV21*	LcrV5 LcrV22*	LcrV24 LcrV5*	LcrV26 LcrV16*	LcrV26 LcrV21*	LcrV26 LcrV24*	LcrV27 LcrV3*	LcrV27 LcrV4*	LcrV27 LcrV11*	LcrV27 LcrV16*	LcrV27 LcrV21*	LcrV27 LcrV22*	LcrV27 LcrV24*	LcrV27 LcrV31*
100 ng/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10 ng/ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1 ng/ml	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-
0,1 ng/ml	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-

B

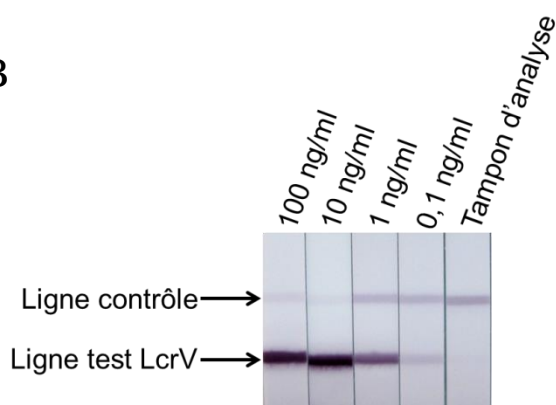


Figure 37 : (A) Sensibilité du test immuno-chromatographique avec les anticorps anti-LcrV avec la protéine recombinante LcrV. Cases (+) : signal colorimétrique perceptible ; cases (-) : pas de signal colorimétrique. (B) Test immuno-chromatographique pour la détection de la protéine recombinante LcrV avec l'anticorps de capture LcrV26 et l'anticorps traceur LcrV16*.

Les analyses combinatoires en bandelettes des anticorps monoclonaux anti-YscF

Pour déterminer le meilleur couple d'AcMs pour un test bandelette YscF, une analyse combinatoire est également réalisée avec les 9 AcMs anti-YscF testés en capture ou en traceur. Les tests sont réalisés avec la bactérie *Y. pestis* NC00570 produisant l'injectisome aux concentrations de 5×10^7 et de 5×10^6 cfu/mL et le surnageant de culture BHI après centrifugation des bactéries.

Sur les 81 combinaisons en bandelette testées, quatre permettent de détecter la protéine native YscF sur les bactéries *Y. pestis* et dans les surnageants de culture (YscF12/YscF15*, YscF15/YscF12*, YscF15/YscF17* et YscF16/YscF17*). Ces 4 combinaisons sont donc sélectionnées pour effectuer des tests supplémentaires pour la détection de la protéine recombinante YscF. Toutes ces combinaisons permettent sa détection et trois (YscF12/YscF15*, YscF15/YscF12* et YscF16/YscF17*) sont assez sensibles pour détecter la protéine recombinante à la concentration de 1 ng/mL soit 143 pM ou 0,1 ng/bandelette (figure 38A). Le signal colorimétrique le plus intense est obtenu avec la bandelette comportant l'AcM de capture YscF16 en combinaison avec l'AcM traceur YscF17* (figure 38B).

A

		Anticorps de capture/Anticorps traceur			
		YscF12	YscF15	YscF15	YscF16
		YscF15*	YscF12*	YscF17*	YscF17*
Protéine recombinante YscF	100 ng/ml	+	+	+	+
	10 ng/ml	+	+	+	+
	1 ng/ml	+	+	-	+
	0,1 ng/ml	-	-	-	-

B

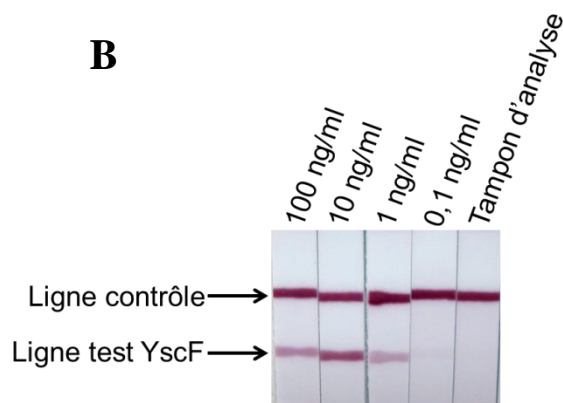


Figure 38 : (A) Sensibilité du test immuno-chromatographique avec les anticorps anti-YscF avec la protéine recombinante YscF. Cases (+) : signal colorimétrique perceptible ; cases (-) : pas de signal colorimétrique. (B) Test immuno-chromatographique pour la détection de la protéine recombinante YscF avec l'anticorps de capture YscF16 et l'anticorps traceur YscF17*.

2.2. La détection des protéines recombinantes par ajout dans des matrices biologiques

Pour la suite, les combinaisons bandelettes LcrV26/LcrV16* et YscF16/YscF17* ont été évaluées avec des matrices biologiques d'urine et de plasma murins plus ou moins diluées en tampon d'analyse (EIA contenant 0,5% de Tween 20) et auxquelles ont été ajoutées artificiellement différentes concentrations des protéines recombinantes LcrV ou YscF.

Pour le test immuno-chromatographique de détection de LcrV (tableau 17), la sensibilité obtenue en urine pure (2,5 ng/mL) est inférieure à celle obtenue en tampon d'analyse (0,1 ng/mL). La sensibilité obtenue en plasma pur (> 0,6 ng/mL) est légèrement plus faible que celle obtenue en tampon EIA (0,1 ng/mL).

Concentration protéine LcrV	Urine pure	Urine 1/2	Urine 1/4	Urine 1/8	
10 ng/mL	+				
5 ng/mL	+	+			
2,5 ng/mL	+	+	+		
1,25 ng/mL	-	+	+	+	
0,6 ng/mL		-	-	-	
0,3 ng/mL			-	-	
0,15 ng/mL				-	

Concentration protéine LcrV	Plasma pur	Plasma 1/2	Plasma 1/4	Plasma 1/8	Plasma 1/16
10 ng/mL	+				
5 ng/mL	+	+			
2,5 ng/mL	+	+	+		
1,25 ng/mL	+	+	+	+	
0,6 ng/mL	+	+	+	+	+
0,3 ng/mL		-	-	+	+
0,15 ng/mL			-	-	-

Tableau 17 : Sensibilités du test immuno-chromatographique (LcrV26/LcrV16*) pour la détection de LcrV dans les matrices biologiques urine ou plasma. Cases (+) : signal colorimétrique perceptible ; cases (-) : pas de signal colorimétrique ; cases vides : test non effectué.

Concernant la détection de YscF par le test immuno-chromatographique (tableau 18), un effet inhibiteur de l'urine et du plasma est observé. En effet, la sensibilité obtenue dans ces matrices est diminuée d'un facteur 60 par rapport à la sensibilité en tampon d'analyse (1 ng/mL). En plasma, l'effet inhibiteur est identique.

Concentration protéine YscF	Urine pure	Urine 1/2	Urine 1/4	Urine 1/8	Urine 1/16
1000 ng/mL	+				
500 ng/mL	+	+			
250 ng/mL	+	+	+		
125 ng/mL	+	+	+	+	
62,5 ng/mL	+	+	+	+	-
31,2 ng/mL		+	+	+	-
15,6 ng/mL			-	-	-

Concentration protéine YscF	Plasma pur	Plasma 1/2	Plasma 1/4	Plasma 1/8	Plasma 1/16
1000 ng/mL	+				
500 ng/mL	+	+			
250 ng/mL	+	+	+		
125 ng/mL	+	+	+	+	
62,5 ng/mL	+	+	+	+	+
31,2 ng/mL		+	+	+	+
15,6 ng/mL			+	+	+
7,8 ng/mL				+	+
3,9 ng/mL					-

Tableau 18 : Sensibilités du test immuno-chromatographique (YscF16/YscF17*) pour la détection de YscF dans les matrices biologiques urine ou plasma. Cases (+) : signal colorimétrique perceptible ; cases (-) : pas de signal colorimétrique ; cases vides : test non effectué.

3. Discussions et perspectives

Aujourd'hui, le diagnostic de la peste est devenu un vrai défi car la plupart des cas humains apparaissent dans des zones ne disposant que de laboratoires peu équipés. Le développement récent de moyens de diagnostic rapides, et plus particulièrement des bandelettes, offre de nouvelles possibilités pour surveiller et confirmer les cas de peste en zone épidémique. Des tests rapides et simples à mettre en œuvre basés sur l'immuno-détection (ELISA ou tests bandelettes) de l'antigène F1 ont été développés dans le passé avec succès (166). Cependant, il apparaît aujourd'hui que l'antigène F1 n'est pas essentiel à la virulence de *Y. pestis* et que des souches pathogènes n'exprimant pas cet antigène existent et ont été isolées (311). Des souches pathogènes naturelles mais également modifiées à des fins malveillantes peuvent donc échapper aux tests de diagnostic utilisant cet antigène. La détection d'antigènes essentiels à la virulence de *Y. pestis* comme les protéines de l'injectisome codées par le plasmide pYV apparaît aujourd'hui plus pertinente. En effet, une de ces protéines, LcrV, est sécrétée (276) et est retrouvée dans le sérum et les poumons de souris infectées de façon plus précoce que l'antigène F1 (24 h après l'infection) (310). Pourtant, il n'existe pas de tels tests commercialisés permettant la détection de ces antigènes. Seul un test ELISA pour la détection de LcrV publié en 2005 a été décrit (312). Les limites de détection atteintes par ce test ELISA étaient de 0,1 ng/mL pour la

protéine recombinante LcrV dans le tampon d'analyse et de 0,5 ng/mL pour la protéine native LcrV dans une matrice biologique complexe (sang et crachat humains). Aucun test de détection de YscF n'a été publié même si elle est également sécrétée lors de l'infection (275).

Avec les AcMs spécifiques de LcrV et YscF obtenus au cours de ce doctorat, nous avons réalisé les premières étapes du développement d'un test de diagnostic immuno-enzymatique (EIA) et d'un test immuno-chromatographique (bandelettes) rapides et simples à utiliser pour la détection de ces deux protéines de l'injectisome de *Y. pestis*. Les sensibilités obtenues en EIA ou en bandelettes avec le tampon d'analyse sont identiques (0,1ng/mL pour LcrV et 1 ng/mL pour YscF) mais sont plus faibles lorsque la détection est réalisée dans des matrices biologiques complexes (urine et plasma).

Il semble intéressant de tester ces deux matrices biologiques, car si les deux protéines sont sécrétées et retrouvées dans le plasma, il est fort probable qu'elles soient aussi présentes dans l'urine. En effet, toutes les protéines d'un poids moléculaire inférieur à 69 kDa (37 kDa pour LcrV et 7 kDa pour YscF) sont librement filtrées par la membrane basale glomérulaire et retrouvées dans l'urine. Ainsi pour la détection de LcrV dans les matrices biologiques, les sensibilités obtenues en EIA ou en bandelettes sont comparables (respectivement 4,8 et 2,5 ng/mL en urine ; 2,5 et 0,6 ng/mL en plasma). Pour la détection de LcrV dans les matrices biologiques, les sensibilités obtenues en EIA ou en bandelettes sont fortement modifiées (6,4 ng/mL pour l'EIA en urine et 6,25 ng/mL en plasma contre 62,5 ng/mL pour les bandelettes dans les deux matrices).

Concernant la détection de LcrV, sa concentration dans les fluides biologiques humains n'a pas été déterminée. Elle a cependant été précisée chez la souris (310) : dans un modèle de peste bubonique, on retrouve en moyenne dans le sérum 0,4 ng/mL, 0,5 ng/mL et 40 ng/mL (24 h, 36 h et 48 h post-infection) de LcrV. Dans un modèle de peste pulmonaire, la quantité moyenne de protéine LcrV dans le sérum n'a pu être quantifiée à 24 h post-infection mais est en moyenne de 6,1 ng/mL à 36 h et de 30,3 ng/mL à 48 h. La protéine est également détectable dans les lavages broncho-alvéolaires dès 36 h post-infection (7,1 ng/ml) et avant la dissémination vers le sang. Selon ces données, il semblerait que nos deux tests immunologiques soient capables de détecter chez les souris la présence de LcrV dans le sérum entre 24 h et 36 h après l'infection en cas de peste bubonique et dès 36 h après l'infection dans le sérum en cas de peste pulmonaire. La détection dans le lavage broncho-alvéolaire reste à être évalué.

Notre dosage immuno-enzymatique de LcrV réalisé en tampon d'analyse est aussi sensible que l'ELISA précédemment publié (0,1 ng/mL) (312). Dans des matrices biologiques plus complexes (urine et plasma), notre EIA permet de détecter des concentrations équivalentes à celle obtenue avec l'ELISA publié (0,5 ng/mL). Cependant des optimisations peuvent encore être effectuées pour à la fois augmenter la sensibilité et diminuer le temps d'analyse (24 h pour l'EIA). La détection de la protéine YscF, dont les concentrations au cours de l'infection sont inconnues, reste à préciser.

Le format bandelette que nous proposons permet une détection rapide (40 min) et économique ne nécessitant pas de manipulations et d'appareillages spécifiques, ce qui en fait un format facilement

utilisable en dehors des laboratoires. Une collaboration est en cours avec l'Unité des *Yersinia* à l'Institut Pasteur et va permettre dans les prochains mois d'évaluer la sensibilité de ces tests bandelettes dans des modèles murins d'infection de peste bubonique et pulmonaire. A terme, un test bandelette « multiplex » permettant la détection simultanée de plusieurs antigènes sécrétés comme LcrV et YscF, mais également de la bactérie elle-même (AcMs dirigés contre l'antigène Pla ou contre d'autres épitopes membranaires précédemment produits au laboratoire (167)).

Il est à présent nécessaire de continuer à évaluer ces tests immunométriques avec les protéines natives. Ceci permettra également de quantifier la protéine native produite par la bactérie *Y. pestis* par rapport aux concentrations de protéines recombinante détectées.

PARTIE II : DÉVELOPPEMENT DE TESTS RAPIDES POUR LA DÉTECTION DES *YERSINIA* ENTÉROPATHOGÈNES

I. La production et la sélection des anticorps monoclonaux

1. Le choix des antigènes

Nous souhaitons développer des tests immunométriques de diagnostic rapides des *Yersinia* entéropathogènes. Pour cela, il était nécessaire d'obtenir des anticorps spécifiques des *Yersinia* que nous avons sélectionnées. En effet, du fait de leur plus forte prévalence en France ou de leur association avec des symptômes sévères, les biosérotypes pathogènes 2/O:9 et 4/O:3 de *Y. enterocolitica* et les sérotypes pathogènes I et III de *Y. pseudotuberculosis* ont été choisis comme immunogènes. Idéalement, nous souhaitons obtenir des anticorps ciblant des antigènes communs des espèces entéropathogènes *Y. enterocolitica* ou *Y. pseudotuberculosis*. Avant immunisation des souris, les bactéries sont cultivées à 37°C. Du fait de leur pathogénicité pour la souris et des fortes doses nécessaires pour l'immunisation (10^8 cfu/injection), les bactéries sont inactivées à la chaleur avant leur injection.

2. La première campagne d'immunisation

2.1. La production et la sélection des hybridomes

L'immunisation et la fusion

Pour produire des AcMs contre les *Yersinia* entéropathogènes, des souris Biozzi sont immunisées avec un mélange contenant des *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 en quantité équivalente (immunisation Ye) ou un mélange contenant des *Y. pseudotuberculosis* I et III en quantité équivalente (immunisation Yps). Pour chaque immunisation, les deux souris présentant la meilleure réponse immunitaire, c'est-à-dire le meilleur titre en anticorps polyclonaux spécifiques des *Yersinia* présents dans le plasma, sont choisies afin d'effectuer la fusion entre leurs splénocytes et les cellules de myélome murin NS1. Pour l'immunisation Ye, les deux souris sélectionnées présentent des titres élevés et comparables en anticorps polyclonaux dirigés contre *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 et plus

faibles contre la souche non spécifique *Y. enterocolitica* 1A (figure 39). Pour l'immunisation Yps, les deux souris sélectionnées présentent des titres élevés et comparables en anticorps polyclonaux dirigés contre *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I et III (figure 40). Dans un premier temps, tous les hybridomes obtenus sont sélectionnés par visualisation des plaques de fusion au microscope. Pour les immunisations Ye et Yps, le nombre d'hybridomes obtenus est respectivement de 1219 et de 386.

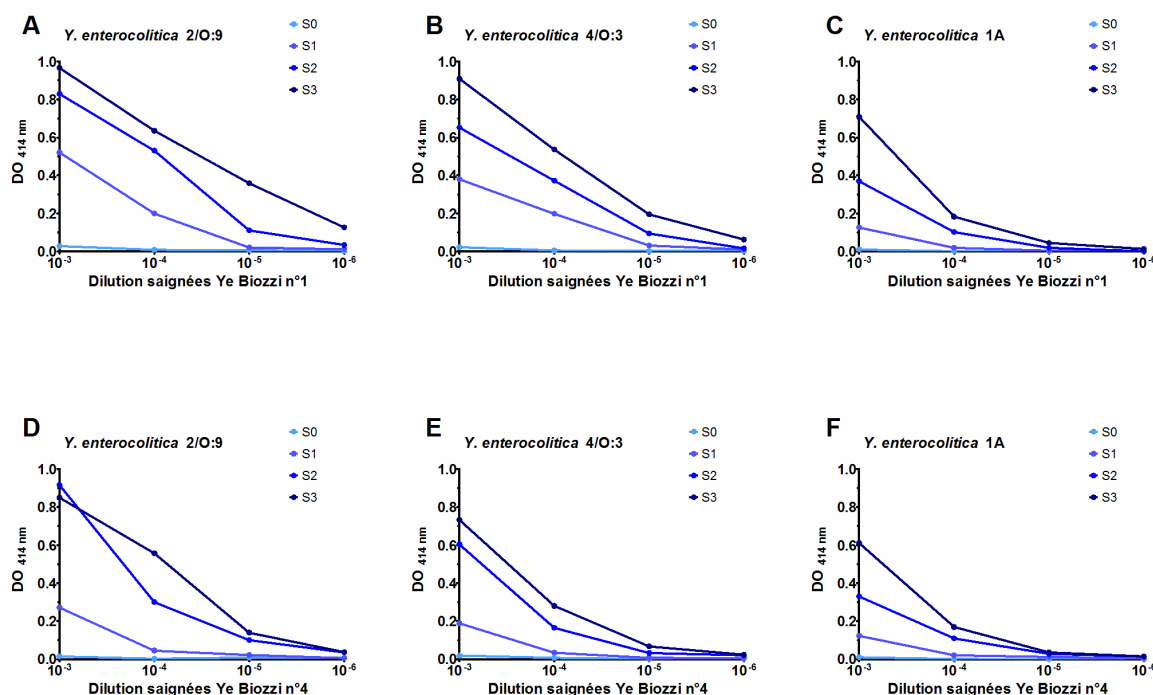


Figure 39 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées au fond des puits des plaques et les différentes saignées diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) Saignées de la souris Biozzi n°1 avec *Y. enterocolitica* 1A. (D) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (E) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (F) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec *Y. enterocolitica* 1A.

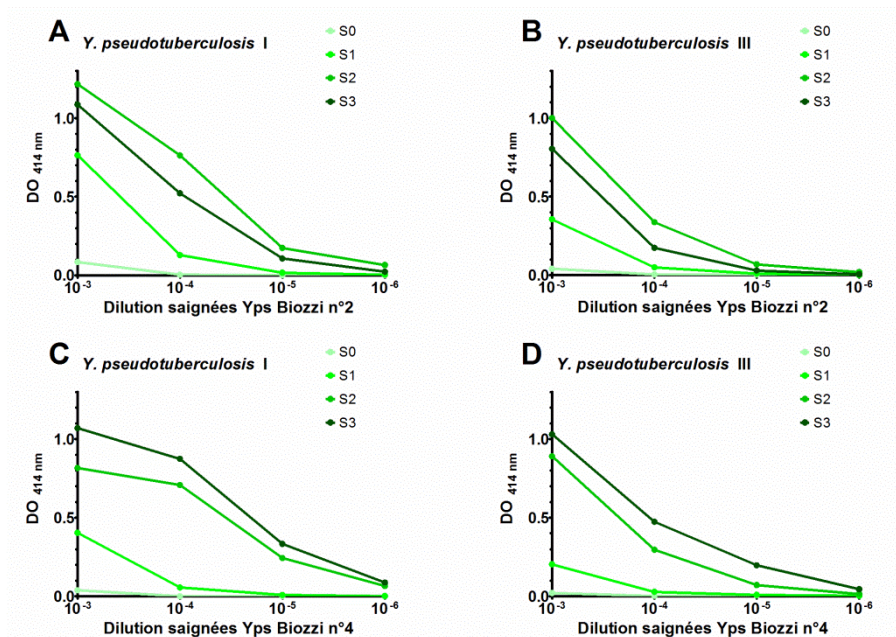


Figure 40 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris sélectionnées pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées au fond des puits des plaques et les différentes saignées diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées de la souris Biozzi n°2 avec *Y. pseudotuberculosis* I. (B) Saignées de la souris Biozzi n°2 avec *Y. pseudotuberculosis* III. (C) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec *Y. pseudotuberculosis* I. (D) Saignées de la souris Biozzi n°4 avec *Y. pseudotuberculosis* III.

La sélection des hybridomes

Afin d'identifier les hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre les *Yersinia* entéropathogènes utilisées pour les immunisations, leurs surnageants de culture sont criblés par ELISA utilisant des souches de *Yersinia* adsorbées sur phase solide pour lesquelles on recherche un signal positif pour les souches d'intérêt et négatif pour les souches non spécifiques. A la suite de l'immunisation Ye, le criblage est réalisé en utilisant les souches d'intérêt *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 séparément et la souche non spécifique *Y. enterocolitica* 1A (exemple des plaques n°44 sur la figure 41). Pour l'immunisation Yps, le criblage est effectué en utilisant les souches d'intérêt *Y. pseudotuberculosis* I et III séparément et un mélange des souches non spécifiques *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 (exemple des plaques n°234 sur la figure 42). Les hybridomes sélectionnés permettent d'obtenir des signaux sur les plaques de microtitration contenant leurs bactéries d'intérêt.

Pour chaque immunisation, 30 hybridomes sont sélectionnés.

Plaque <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				0,240					0,166			0,539
B												
C					0,198				0,068			
D			0,108							0,121		
E												
F						0,113						
G	0,444			0,330					0,074			
H						0,169						

Plaque <i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				0,133					0,169			0,009
B												
C					0,077				0,098			
D			0,004							0,081		
E												
F						0,026						
G	0,015			0,012					0,204			
H						0,022						

Plaque <i>Y. enterocolitica</i> 1A												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A				0,205					0,073			0,158
B												
C					0,059				0,170			
D			0,000							0,014		
E												
F						0,004						
G	0,123			0,080					0,110			
H						0,115						

Figure 41 : Sélections des hybridomes issus de la fusion Ye sur des plaques de microtitration contenant des bactéries adsorbées. Cases blanches : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes non sélectionnés (non sécréteurs d'anticorps d'intérêt) ; cases jaunes : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes sécréteurs d'anticorps ; cases oranges : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes sécréteurs d'anticorps sélectionnés pour le clonage.

Plaque <i>Y. pseudotuberculosis</i> I												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							0,125					
B	0,119		0,171						0,286			
C												0,217
D	0,101											
E			0,120									
F												
G	0,112									0,196		
H			0,118									

Plaque <i>Y. pseudotuberculosis</i> III												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							0,073					
B	0,080		0,140						0,303			
C												0,132
D	0,064											
E			0,089									
F												
G	0,057									0,170		
H			0,063									

Plaque <i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9 + 4/O:3												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A							0,062					
B	0,053		0,058						0,152			
C												0,101
D	0,072											
E												
F												
G	0,050									0,044		
H			0,060									

Figure 42 : Sélections des hybridomes issus de la fusion Yps sur des plaques de microtitration contenant des bactéries adsorbées. Cases blanches : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes non sélectionnés (non sécréteurs d'anticorps d'intérêt) ; cases jaunes : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes sécréteurs d'anticorps ; cases oranges : DO_{414 nm} obtenues pour des hybridomes sécréteurs d'anticorps sélectionnés pour le clonage.

Le clonage des hybridomes

Par la suite, les hybridomes sélectionnés sont clonés par dilution limite. Des criblages par ELISA direct sont effectués à chaque étape du clonage et jusqu'à l'obtention de populations clonales afin de ne conserver que les hybridomes sécrétant des anticorps monoclonaux contre leurs souches *Yersinia* d'intérêt. Le criblage pour l'immunisation Ye est réalisé avec les souches d'intérêt *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 séparément alors que pour l'immunisation Yps, ce sont les souches d'intérêt *Y. pseudotuberculosis* I et III qui sont utilisées séparément.

Au final, ce sont respectivement 15 et 14 hybridomes qui se révèlent être sécréteurs d'AcMs dirigés contre leurs souches d'intérêt pour les immunisations Ye et Yps.

L'obtention des anticorps monoclonaux

Les hybridomes des clones obtenus sont injectés à des souris BALB/c-nu afin de produire les AcMs sous forme de liquide d'ascite. Ceux-ci sont purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A. Les AcMs obtenus à la suite des immunisations Ye et Yps sont respectivement appelés Ye et Yps, suivi du numéro de clone correspondant (tableau 19).

Nom	Isotype	Nom	Isotype
Ye1	IgG2c	Yps1	IgG1
Ye2	IgG2b	Yps2	IgG2b
Ye3	IgG2c	Yps3	IgG2b
Ye4	IgG2c	Yps4	IgG2c
Ye5	IgG1	Yps8	IgG2b
Ye6	IgG2c	Yps9	IgG2c
Ye7	IgG2c	Yps11	IgG1
Ye9	IgG2b	Yps12	IgG2c
Ye12	IgG2c	Yps13	IgG2c
Ye13	IgG2c	Yps14	IgG2c
Ye14	IgG2c	Yps15	IgG1
Ye15	IgG2c	Yps16	IgG1
Ye16	IgM	Yps17	IgG2b
Ye17	IgG2b	Yps18	IgG1
Ye18	IgG1		

Tableau 19 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux Ye et Yps produits.

2.2. Les analyses combinatoires

Une analyse combinatoire des AcMs est menée afin d'évaluer leur capacité de liaison aux bactéries (principe du test voir figure 16B).

La spécificité

Les analyses combinatoires sont réalisées afin de détecter les meilleures combinaisons d'AcMs utilisables dans un test immunométrique à deux sites (ELISA sandwich). Ce test consiste à utiliser chaque AcM en tant qu'AcM de capture ou en tant qu'AcM traceur après couplage à la biotine. Ainsi les analyses combinatoires permettent pour chaque combinaison d'AcMs de déterminer :

- la spécificité pour le genre *Yersinia* comparé à d'autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*),
- la spécificité entre les deux *Yersinia* entéropathogènes (*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*),
- la spécificité entre différents biosérotypes de *Y. enterocolitica* (2/O:9 ou 4/O:3 contre 1A 1B, 2/O:5,27) et différents sérotypes de *Y. pseudotuberculosis* (I, III, V).

Toutes les bactéries sont utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL soit 5×10^6 cfu/puits.

Sur les 225 combinaisons testées avec les AcMs Ye, 56 permettent la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 mais aucune la détection du biosérotype 4/O:3 (tableau 20). Parmi ces 56 combinaisons, 8 montrent un manque de spécificité avec la détection de *E. coli*.

		Anticorps traceur															
		Ye1	Ye2	Ye3	Ye4	Ye5	Ye6	Ye7	Ye9	Ye12	Ye13	Ye14	Ye15	Ye16	Ye17	Ye18	
Anticorps de capture	Ye1																
	Ye2																
	Ye3																
	Ye4																
	Ye5																
	Ye6																
	Ye7																
	Ye9																
	Ye12																
	Ye13																
	Ye14																
	Ye15																
	Ye16																
	Ye17																
Ye18																	

Tableau 20 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Ye avec *Y. enterocolitica* 2/O:9 à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Cases blanches : $DO_{414\text{ nm}} < 0,05$; cases jaunes : $0,05 < DO_{414\text{ nm}} < 0,2$; cases oranges : $0,2 < DO_{414\text{ nm}} < 0,6$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,6$. Les cases avec une croix indiquent la détection de bactéries non spécifiques (*E. coli*).

Sur les 196 combinaisons testées avec les AcMs Yps, 52 permettent la détection de *Y. pseudotuberculosis* I mais aucune la détection du sérotype III (tableau 21). Parmi ces 52 combinaisons, 13 font preuve d'un manque de spécificité avec la détection de souches non spécifiques comme *Y. enterocolitica* 4/O:3 ou d'autres entérobactéries testées.

		Anticorps traceur															
		Yps1	Yps2	Yps3	Yps4	Yps8	Yps9	Yps11	Yps12	Yps13	Yps14	Yps15	Yps16	Yps17	Yps18		
Anticorps de capture	Yps1																
	Yps2																
	Yps3																
	Yps4																
	Yps8																
	Yps9																
	Yps11																
	Yps12																
	Yps13																
	Yps14																
	Yps15																
	Yps16																
	Yps17																
	Yps18																

Tableau 21 : Résultats de l'analyse combinatoire Yps avec *Y. pseudotuberculosis* I à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Cases blanches : $DO_{414\text{ nm}} < 0,05$; cases jaunes : $0,05 < DO_{414\text{ nm}} < 0,2$; cases oranges : $0,2 < DO_{414\text{ nm}} < 0,6$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,6$. Les cases avec une croix indiquent la détection de bactéries non spécifiques.

La sensibilité

Par la suite, une deuxième série d'analyses combinatoires est réalisée pour évaluer la sensibilité de ces combinaisons spécifiques d'AcMs en utilisant des dilutions en série (10^7 cfu/mL à 10^4 cfu/mL) des souches d'intérêt de *Yersinia*. Ainsi les meilleures combinaisons d'AcMs Ye et Yps permettent la détection d'environ 10^5 cfu/mL de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et de *Y. pseudotuberculosis* I. Les meilleures sensibilités sont obtenues lorsque les AcMs traceurs Ye18* et Yps2* sont utilisés dans la combinaison (tableau 22).

		Anticorps traceur					
		Ye4	Ye7	Ye9	Ye12	Ye14	Ye18
Anticorps de capture	Ye2						
	Ye3						
	Ye4						
	Ye6						
	Ye7						
	Ye9						
	Ye12						
	Ye13						
	Ye14						
	Ye16						
	Ye18						
	Ye18						

		Anticorps traceur				
		Yps2	Yps9	Yps11	Yps12	Yps18
Anticorps de capture	Yps1					
	Yps2					
	Yps4					
	Yps8					
	Yps9					
	Yps11					
	Yps12					
	Yps13					
	Yps15					
	Yps16					
	Yps17					
	Yps18					

Tableau 22 : Résultats de l'analyse combinatoire. (A) Sensibilités des anticorps Ye avec des dilutions en série de *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) Sensibilités des anticorps Yps avec des dilutions en série *Y. pseudotuberculosis* I. Cases blanches : test non réalisé ; cases grises : sensibilité supérieure à 10⁷ cfu/mL ; cases jaunes : sensibilité 10⁷ cfu/mL ; cases oranges : sensibilité 10⁶ cfu/mL ; cases rouges : sensibilité 10⁵ cfu/mL.

Au début de cette étude, nous souhaitions obtenir des anticorps communs aux différentes *Yersinia* entéropathogènes (*Y. enterocolitica* d'une part, et *Y. pseudotuberculosis* d'autre part), ou ciblant différents biosérotypes de *Y. enterocolitica* et sérotypes de *Y. pseudotuberculosis*. Malheureusement, nous n'avons pas pu obtenir d'anticorps capables de reconnaître spécifiquement les différentes *Yersinia* entéropathogènes (sans reconnaissance d'autres bactéries gram(-) et d'autre part, seul le biosérotype 2/O:9 et le sérotype I étaient ciblés par nos AcMs. Il a donc été nécessaire de produire de nouveaux AcMs contre les biotypes et sérotypes pathogènes « manquants » des *Yersinia*.

3. La deuxième campagne d'immunisation

3.1. La production et la sélection des hybridomes

L'immunisation et la fusion

Comme précédemment, pour produire des AcMs dirigés contre les *Yersinia* entéropathogènes, des souris Biozzi sont immunisées avec des *Y. enterocolitica* 4/O:3 (immunisation Ye4/O:3) ou des *Y. pseudotuberculosis* III (immunisation YpsIII). Les anticorps polyclonaux présents dans le plasma des souris immunisées sont titrés par ELISA avec différentes bactéries adsorbées dans les puits des plaques de microtitration. Pour l'immunisation Ye4/O:3, les deux souris sélectionnées présentent des titres élevés et comparables en anticorps polyclonaux dirigés contre *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 mais également élevés contre la souche non spécifique *Y. pseudotuberculosis* I (Figures 43 et 44). Pour l'immunisation YpsIII, les deux souris sélectionnées présentent des titres élevés et comparables

en anticorps polyclonaux dirigés contre *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I et III (Figures 45 et 46) et des titres en anticorps polyclonaux faibles pour les souches non spécifiques testées.

Au vu des réponses immunitaires des souris sélectionnées, il faut donc être très vigilant lors des criblages pour ne pas sélectionner d'hybridomes sécrétant des anticorps contre une souche non spécifique. Pour les immunisations Ye4/O:3 et YpsIII, le nombre d'hybridomes obtenus est respectivement de 1120 et de 1320.

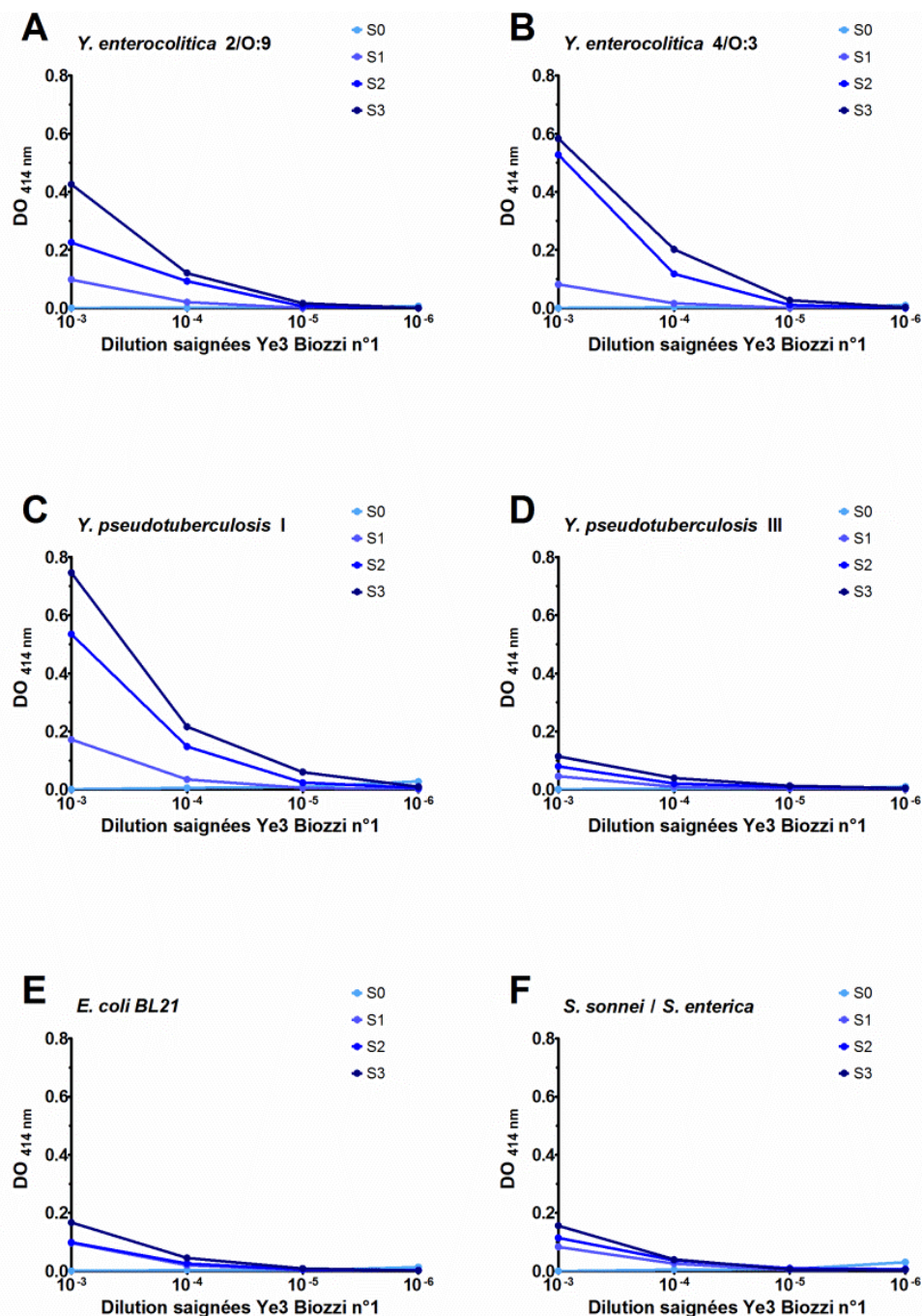


Figure 43 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°1 immunisée avec *Y. enterocolitica* 4/O :3 et sélectionnée pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées dans les puits des plaques de microtitration et les différentes saignées sont diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) Saignées avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* I. (D) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* III. (E) Saignées avec *E. coli* BL21. (F) Saignées avec *S. sonnei* et *S. enterica* sérovar Typhimurium.

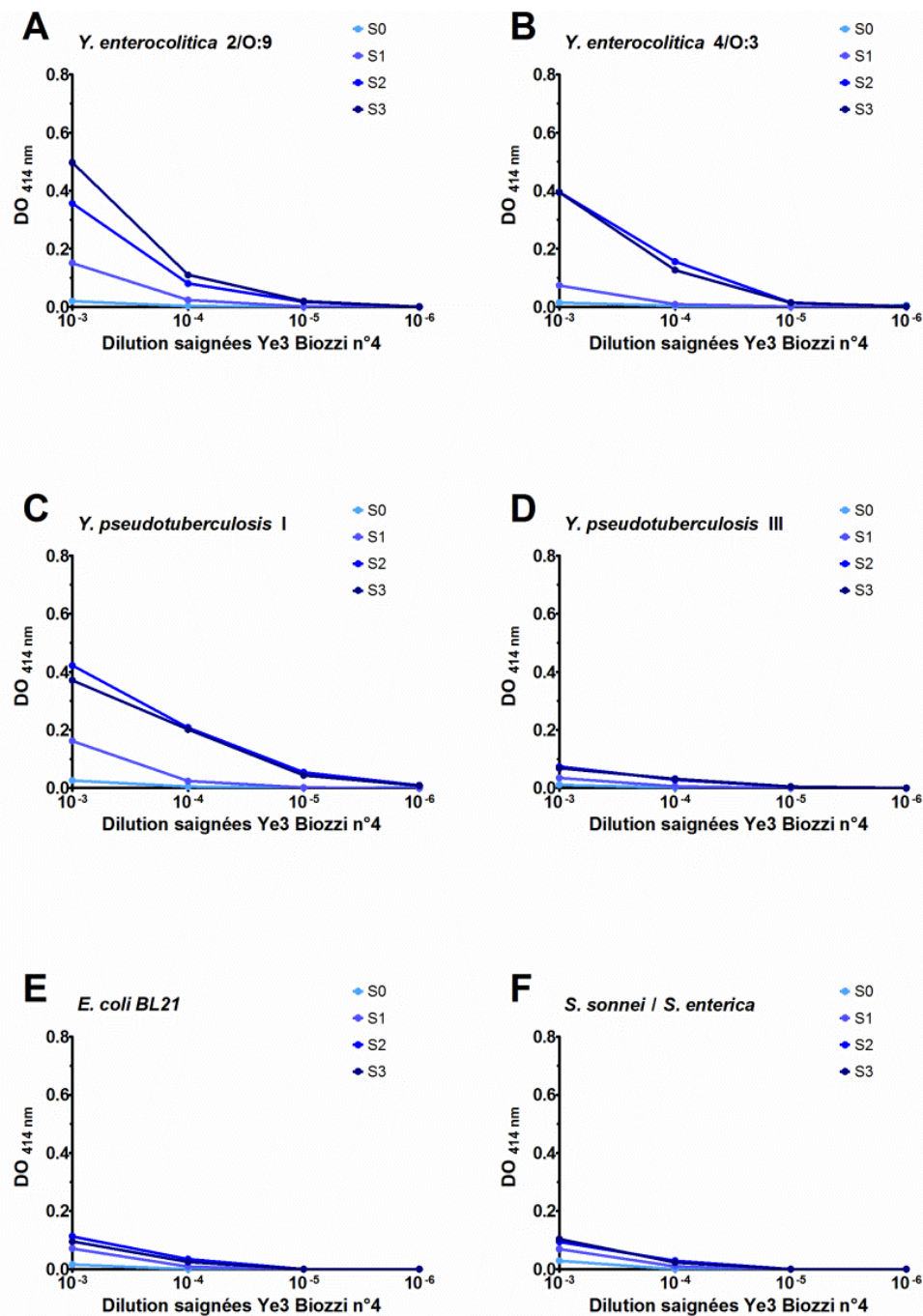


Figure 44 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°4 immunisée avec *Y. enterocolitica* 4/O:3 et sélectionnée pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées dans les puits des plaques de microtitration et les différentes saignées sont diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) Saignées avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* I. (D) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* III. (E) Saignées avec *E. coli* BL21. (F) Saignées avec *S. sonnei* et *S. enterica* sérovar Typhimurium.

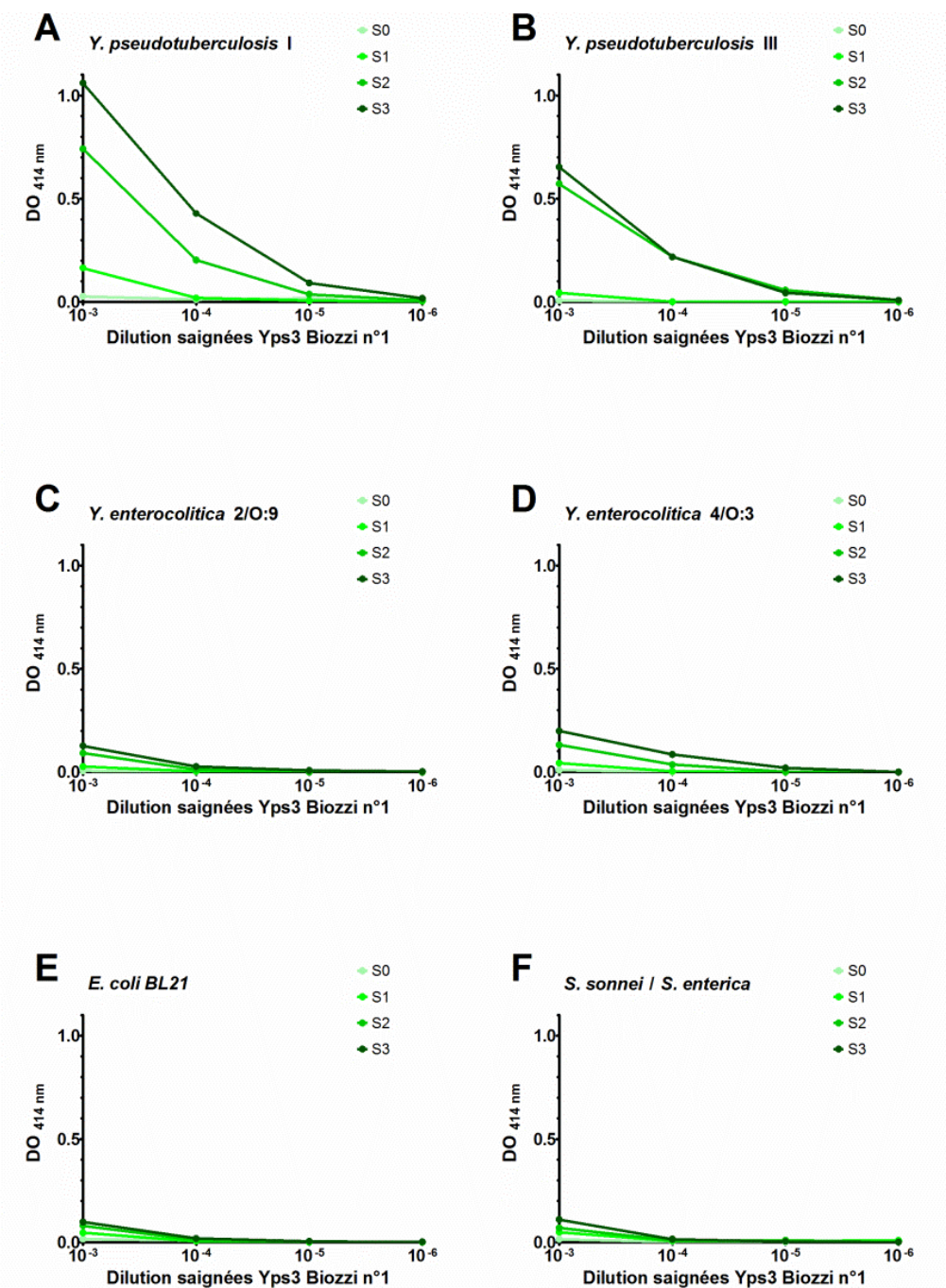


Figure 45 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°1 immunisée avec *Y. pseudotuberculosis* I et sélectionnée pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées sur plaque et les différentes saignées diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* I. (B) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* III. (C) Saignées avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (D) Saignées avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (E) Saignées avec *E. coli* BL21. (F) Saignées avec *S. sonnei* et *S. enterica* sérovar Typhimurium.

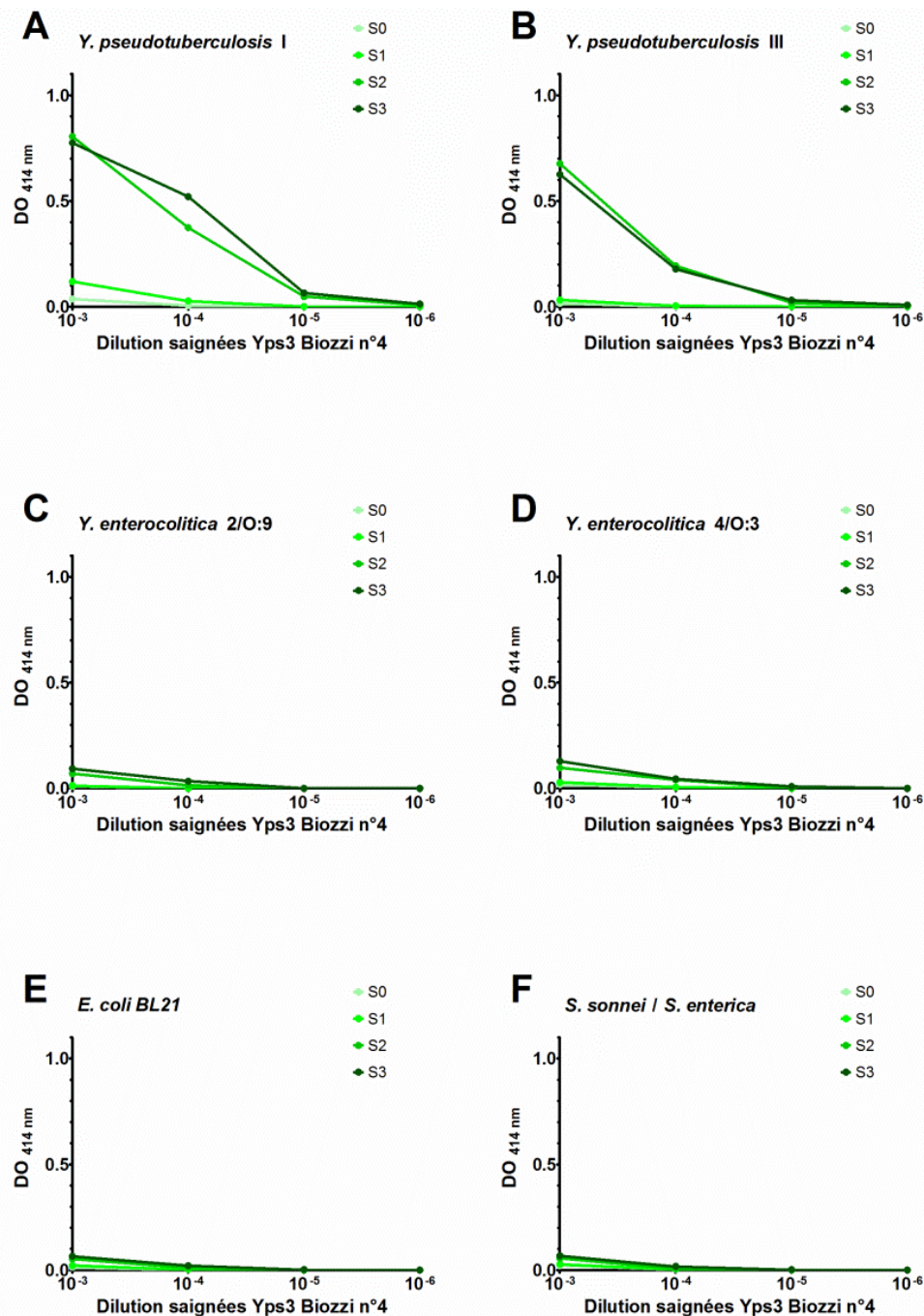


Figure 46 : Titres en anticorps polyclonaux présents dans le plasma de la souris Biozzi n°4 immunisée avec *Y. pseudotuberculosis* I et sélectionnée pour effectuer la fusion. Le test est réalisé par ELISA avec des bactéries adsorbées sur plaque et les différentes saignées diluées en tampon EIA (principe du test voir figure 15). (A) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* I. (B) Saignées avec *Y. pseudotuberculosis* III. (C) Saignées avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (D) Saignées avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (E) Saignées avec *E. coli* BL21. (F) Saignées avec *S. sonnei* et *S. enterica* sérovar Typhimurium.

La sélection des hybridomes

La stratégie de criblage pour identifier les hybridomes sécrétant des anticorps dirigés contre les *Yersinia* entéropathogènes utilisées pour l'immunisation est modifiée par rapport à celle utilisée lors de la première campagne d'immunisation. Trois criblages par ELISA direct sont effectués afin de sélectionner les hybridomes.

Le premier criblage est uniquement effectué en utilisant les souches d'intérêt (*Y. enterocolitica* 4/O:3 pour l'immunisation Ye4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* III pour immunisation YpsIII). Tous les hybridomes donnant une réponse contre la souche d'intérêt sont sélectionnés pour le clonage et le criblage suivant (144 pour l'immunisation Ye4/O:3 et 138 pour l'immunisation YpsIII).

Le clonage des hybridomes

Au cours du clonage des hybridomes par dilution limite, un deuxième criblage est effectué en utilisant la souche d'intérêt mais aussi d'autres souches non spécifiques. Pour l'immunisation Ye4/O:3 il s'agit de *Y. enterocolitica* 2/O:9, d'un mélange de *Y. pseudotuberculosis* I et III, et de *E. coli*. Pour l'immunisation YpsIII il s'agit de *Y. pseudotuberculosis* I, d'un mélange de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3, et de *E. coli*. Seuls les hybridomes donnant une réponse positive avec la souche d'intérêt sont sélectionnés au cours de la première étape du clonage (37 pour l'immunisation Ye4/O:3 et 42 pour l'immunisation YpsIII).

Un troisième criblage est effectué en utilisant les souches précédemment utilisées lors du deuxième criblage et des souches non spécifiques supplémentaires. Pour l'immunisation Ye4/O:3, il s'agit de *Y. enterocolitica* 1A, 1B et 2/O:5,27, et d'un mélange de *S. sonnei* et de *S. enterica* sérovar Typhimurium. Pour l'immunisation YpsIII, il s'agit de *Y. pseudotuberculosis* V et d'un mélange de *S. sonnei* et de *S. enterica* sérovar Typhimurium. Les hybridomes donnant une réponse positive avec la souche d'intérêt sont sélectionnés (20 pour chaque immunisation Ye4/O:3 et YpsIII).

Enfin, lors de l'obtention de populations clonales et pour ne conserver que les hybridomes ne sécrétant des anticorps que contre leurs souches d'intérêt de *Yersinia*, les criblages suivants sont effectués avec la souche utilisée lors de l'immunisation et la souche non spécifique *E. coli*.

Au final, ce sont respectivement 13 et 17 hybridomes qui se révèlent être sécréteurs d'AcMs dirigés contre leurs souches d'intérêt pour les immunisations Ye4/O:3 et YpsIII.

L'obtention des anticorps monoclonaux

Les hybridomes sélectionnés sont injectés à des souris BALB/c-nu afin de produire les AcMs sous forme de liquide d'ascite. Ceux-ci sont purifiés par chromatographie d'affinité sur protéine A. Les AcMs obtenus à la suite des immunisations Ye4/O:3 et YpsIII sont respectivement appelés Ye3 et Yps1, suivi du numéro de clone correspondant (tableau 23)

Nom	Isotype	Nom	Isotype
Ye300	IgG2b	Yps100	IgM
Ye304	IgG1	Yps101	IgG2a
Ye305	IgG1	Yps102	IgG3
Ye306	IgG1	Yps103	IgG3
Ye309	inconnu	Yps104	IgG1
Ye310	IgG2b	Yps105	IgG3
Ye311	IgG1	Yps106	IgG3
Ye312	IgG1	Yps107	IgG3
Ye313	IgG2b	Yps108	IgG3
Ye314	IgG1	Yps109	IgG2a
Ye315	IgG1	Yps110	IgG3
Ye316	IgG2b	Yps111	IgG2a
Ye317	IgG2b	Yps112	IgG3
		Yps113	IgG1
		Yps114	IgG2b
		Yps115	IgG3
		Yps116	IgG3

Tableau 23 : Dénominations et isotypes des anticorps monoclonaux Ye3 et Yps1 produits.

3.2. Les analyses combinatoires

Les spécificités

Les analyses combinatoires sont réalisées comme précédemment.

Sur les 169 combinaisons testées avec les AcMs Ye3, seulement 11 détectent *Y. enterocolitica* 4/O:3 (tableau 24). Seul l'AcM Ye300 utilisé en combinaison (anticorps de capture et traceur) permet d'obtenir un signal optique fort ($DO_{414\text{ nm}}=1,106$).

		Anticorps traceur														
		Ye 300	Ye 304	Ye 305	Ye 306	Ye 309	Ye 310	Ye 311	Ye 312	Ye 313	Ye 314	Ye 315	Ye 316	Ye 317		
Anticorps de capture	Ye 300															
	Ye3 04															
	Ye 305															
	Ye 306															
	Ye 309															
	Ye 310															
	Ye 311															
	Ye 312															
	Ye 313															
	Ye 314															
	Ye 315															
	Ye 316															
	Ye 317															

Tableau 24 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Ye3 avec *Y. enterocolitica* 4/O:3 à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Cases blanches : $DO_{414\text{ nm}} < 0,05$; cases jaunes : $0,05 < DO_{414\text{ nm}} < 0,2$; cases oranges : $0,2 < DO_{414\text{ nm}} < 0,6$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,6$.

Sur les 289 combinaisons testées avec les AcMs Yps1, la majorité (265) détecte *Y. pseudotuberculosis* III (tableau 25). Parmi ces combinaisons, 16 manquent de spécificité avec la détection de *Yersinia* non spécifiques et d'autres entérobactéries testées.

		Anticorps traceur														
		Yps 100	Yps 101	Yps 102	Yps 103	Yps 104	Yps 105	Yps 106	Yps 107	Yps 108	Yps 109	Yps 110	Yps 111	Yps 112	Yps 113	Yps 114
Anticorps de capture	Yps 100															
	Yps 101															
	Yps 102															
	Yps 103															
	Yps 104															
	Yps 105															
	Yps 106															
	Yps 107															
	Yps 108															
	Yps 109															
	Yps 110															
	Yps 111															
	Yps 112															
	Yps 113															
	Yps 114															

Tableau 25 : Résultats de l'analyse combinatoire des anticorps Yps1 sur *Y. pseudotuberculosis* III à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Cases blanches : $DO_{414\text{ nm}} < 0,05$; cases jaunes : $0,05 < DO_{414\text{ nm}} < 0,2$; cases oranges : $0,2 < DO_{414\text{ nm}} < 0,6$; cases rouges : $DO_{414\text{ nm}} > 0,6$. Les cases avec une croix indiquent la détection de bactéries non spécifiques.

Les sensibilités

Les analyses combinatoires pour évaluer la sensibilité des meilleurs couples d'AcMs sont réalisées comme précédemment, en utilisant différentes dilutions en série (10^7 cfu/mL à 10^4 cfu/mL) des souches d'intérêt de *Yersinia*. Les meilleures combinaisons d'AcMs Ye3 et Yps1 permettent respectivement la détection d'environ 10^6 cfu/mL de *Y. enterocolitica* 4/O:3 et 10^5 cfu/mL de *Y. pseudotuberculosis* III. Les meilleures sensibilités sont obtenues lorsque les anticorps traceurs biotinylés Ye300* et Yps104* sont utilisés dans la combinaison (tableau 26).

A

		Anticorps traceur				
		Ye 300	Ye 305	Ye 315	Ye 316	Ye 317
Anticorps de capture	Ye 300					
	Ye 305					
	Ye 306					
	Ye 311					
	Ye 314					
	Ye 315					
	Ye 317					

B

		Anticorps traceur																
		Yps 100	Yps 101	Yps 102	Yps 103	Yps 104	Yps 105	Yps 106	Yps 107	Yps 108	Yps 109	Yps 110	Yps 111	Yps 112	Yps 113	Yps 114	Yps 115	Yps 116
Anticorps de capture	Yps 100																	
	Yps 101																	
	Yps 102																	
	Yps 103																	
	Yps 104																	
	Yps 105																	
	Yps 106																	
	Yps 107																	
	Yps 108																	
	Yps 109																	
	Yps 110																	
	Yps 111																	
	Yps 112																	
	Yps 113																	
	Yps 114																	
	Yps 115																	
	Yps 116																	

Tableau 26 : Résultats de l'analyse combinatoire. (A) Sensibilités des anticorps des anticorps Ye3 avec des dilutions en série de *Y. enterocolitica* 4/O:3. (B) Sensibilités des anticorps Yps1 avec des dilutions en série *Y. pseudotuberculosis* III. Cases blanches : test non réalisé ; cases grises : sensibilité supérieure à 10^7 cfu/mL; cases jaunes : sensibilité 10^7 cfu/mL ; cases oranges : sensibilité 10^6 cfu/mL; cases rouges : sensibilité 10^5 cfu/mL.

4. Bilan et discussion

Quatre immunisations différentes ont été nécessaires pour obtenir des AcMs spécifiques des biosérotypes pathogènes 2/O:9 et 4/O:3 de *Y. enterocolitica* et des sérotypes pathogènes I et III de *Y. pseudotuberculosis*. Lors de la première campagne d'immunisation, nous pensions pouvoir obtenir soit des AcMs reconnaissant des antigènes communs aux *Y. enterocolitica* 4/O:3 et 2/O:9 ou aux *Y. pseudotuberculosis* I et III ayant servi d'immunogènes, soit des AcMs spécifiques de chaque biotype de *Y. enterocolitica* ou sérotype de *Y. pseudotuberculosis* en immunisant les souris avec un mélange de ces *Yersinia*. Aucun des AcMs n'était spécifique de *Y. enterocolitica* 4/O:3 pour la série Ye, et de *Y. pseudotuberculosis* III pour la série Yps. Pourtant, les anticorps sécrétés par les hybridomes

sélectionnés lors du premier criblage, effectué avec chaque souche séparément étaient bien spécifiques de l'un ou l'autre sérotype. Cependant, au cours des criblages des étapes de clonage en dilution limite des hybridomes, les souches d'intérêt ont été utilisées en mélange et non plus séparément. Cette stratégie de criblage a sans doute entraîné un biais dans la sélection de clones exclusivement spécifiques de *Y. enterocolitica* 2/O:9 ou de *Y. pseudotuberculosis* I. Ces résultats illustrent parfaitement l'importance, non seulement du choix de l'immunogène, mais surtout du choix de la stratégie de criblage pour la sélection des hybridomes.

De plus, cette sélection a été amplifiée dès le départ par la réponse immunitaire des souris Biozzi immunisées. Celle-ci a en effet peut-être été dirigée plus fortement vers l'une des deux *Yersinia* injectées pourtant en quantités équivalentes et simultanément, en l'occurrence *Y. enterocolitica* 2/O:9 lors de l'immunisation Ye et *Y. pseudotuberculosis* I lors de l'immunisation Yps. Cela s'est traduit par une différence d'intensité des signaux lors du criblage entre les plaques contenant les bactéries d'intérêt adsorbées. Ainsi lors des criblages, la sélection des hybridomes présentant les réponses les plus fortes nous a amenés à sélectionner préférentiellement ces hybridomes spécifiques de *Y. enterocolitica* 2/O:9 ou *Y. pseudotuberculosis* I.

Afin d'obtenir des AcMs spécifiques du biosérotype 4/O:3, ou a minima du sérotype O:3 de *Y. enterocolitica* et du sérotype III de *Y. pseudotuberculosis*, une nouvelle campagne d'immunisation, utilisant chaque cible séparément, a été réalisée. Lors de celle-ci, une nouvelle stratégie de criblage a été mise en place afin de maximiser les chances d'obtenir des AcMs spécifiques. Ainsi un premier criblage des hybridomes a été effectué avec la souche d'intérêt seule et a permis une première sélection de tous les hybridomes présentant un signal positif. Un deuxième criblage, différentiel, comportant la souche d'intérêt seule d'une part ainsi qu'un mélange de souches non spécifiques d'autre part (pour l'immunisation Ye4/O:3 il s'agit de *Y. enterocolitica* 2/O:9, d'un mélange de *Y. pseudotuberculosis* I et III, et de *E. coli*. Pour l'immunisation YpsIII il s'agit de *Y. pseudotuberculosis* I, d'un mélange de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3, et de *E. coli*) a ensuite été réalisé. Il a permis d'éliminer les hybridomes reconnaissant ces souches non spécifiques. Enfin, un troisième criblage comportant les souches précédentes et d'autres souches non spécifiques (pour l'immunisation Ye4/O:3 il s'agit de *Y. enterocolitica* 1A, 1B et 2/O:5,27, et d'un mélange de *S. sonnei* et de *S. enterica* sérovar Typhimurium. Pour l'immunisation YpsIII, il s'agit de *Y. pseudotuberculosis* V et d'un mélange de *S. sonnei* et de *S. enterica* sérovar Typhimurium) a permis une sélection plus fine des hybridomes produisant des AcMs reconnaissant spécifiquement le biosérotype 4/O:3 de *Y. enterocolitica* ou le sérotype III de *Y. pseudotuberculosis*.

Lors des analyses combinatoires, les AcMs obtenus des quatre séries (Ye, Ye3, Yps et Yps1) ont été évalués dans un test immunométrique à deux sites (ELISA sandwich) qui est le format choisi pour le développement d'une méthode d'immuno-diagnostic.

Les analyses combinatoires pour évaluer la spécificité ont permis de caractériser les différentes combinaisons selon trois critères (spécificité pour le genre *Yersinia* comparé à d'autres

entérobactéries ; spécificité entre *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* ; spécificité entre différents biosérotypes de *Y. enterocolitica* et différents sérotypes de *Y. pseudotuberculosis*). Pour les séries Ye et Yps obtenues lors de la première campagne d'immunisation, de nombreuses combinaisons permettent une détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et de *Y. pseudotuberculosis* I. Cependant certaines présentent des réactions croisées avec d'autres entérobactéries non spécifiques (en particulier *E. coli*). La série Ye3 comporte un grand nombre d'AcMs mais seulement 11 combinaisons impliquant les AcMs Ye300, Ye305, Ye311, Ye314, Ye315 et Ye317 sont capables de détecter leur souche d'intérêt *Y. enterocolitica* 4/O:3. Enfin la série Yps1 comporte un très grand nombre de combinaisons d'AcMs permettant la détection de leur souche d'intérêt *Y. pseudotuberculosis* III avec un signal optique fort. Seulement quelques combinaisons présentent des réactions croisées avec d'autres entérobactéries non spécifiques et seul l'AcM Yps106 semble peu sensible.

Concernant les analyses combinatoires pour évaluer la sensibilité des meilleurs couples d'anticorps, elles permettent la détection de 10^5 à 10^6 cfu/ml des souches d'intérêt, sans optimisation du protocole. Ainsi, les AcMs traceurs Ye18*, Ye300*, Yps2* et Yps104* offrent les meilleures sensibilités dans chaque série. Ces AcMs traceurs sont sélectionnés pour le couplage à l'AChE et l'optimisation de nos tests immuno-enzymatiques.

II. Le développement des tests immuno-enzymatiques (EIA)

1. L'optimisation de l'EIA

1.1. Le choix des traceurs couplés à l'acétylcholinestérase

Les AcMs Ye18, Ye300, Yps2 et Yps104 sont sélectionnés. Les AcMs Ye18 et Yps104 sont d'isotype IgG1, ce qui permet de réaliser des F(ab') pour leur couplage à l'AChE ne donnent généralement pas ou peu de bruit de fond lors de leur utilisation dans des tests immuno-enzymatiques. Les AcMs Ye300 et Yps2 sont d'isotype IgG2b, et des F(ab')₂ sont générés à partir des anticorps entiers pour leur couplage à l'AChE. En plus d'augmenter la sensibilité du test EIA, l'utilisation d'anticorps couplés à l'AChE plutôt que des anticorps biotinylés comme traceurs permet d'éliminer l'étape d'incubation avec la streptavidine-AChE d'une durée de 2 h.

1.2. La détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE

L'optimisation du test EIA nécessite de définir une concentration d'utilisation de l'AcM traceur. Pour cela, un ELISA sandwich est réalisé avec différentes concentrations des quatre traceurs

Ye18-AChE, Ye300-AChE, Yps2-AChE et Yps104-AChE en association respective et arbitraire avec les AcMs de capture Ye4, Ye300, Yps4 et Yps114 (combinaisons qui avaient fonctionné lors de l'analyse combinatoire) afin de détecter pour chacun leur *Yersinia* d'intérêt. La concentration en anticorps traceur retenue (en UE/ml finale) est celle donnant le meilleur ratio entre le signal spécifique obtenu et le bruit de fond : 2 UE/ml finale pour Ye18-AChE, 5 UE/ml finale pour les traceurs Ye300-AChE, Yps2-AChE et Yps104-AChE (figure 47).

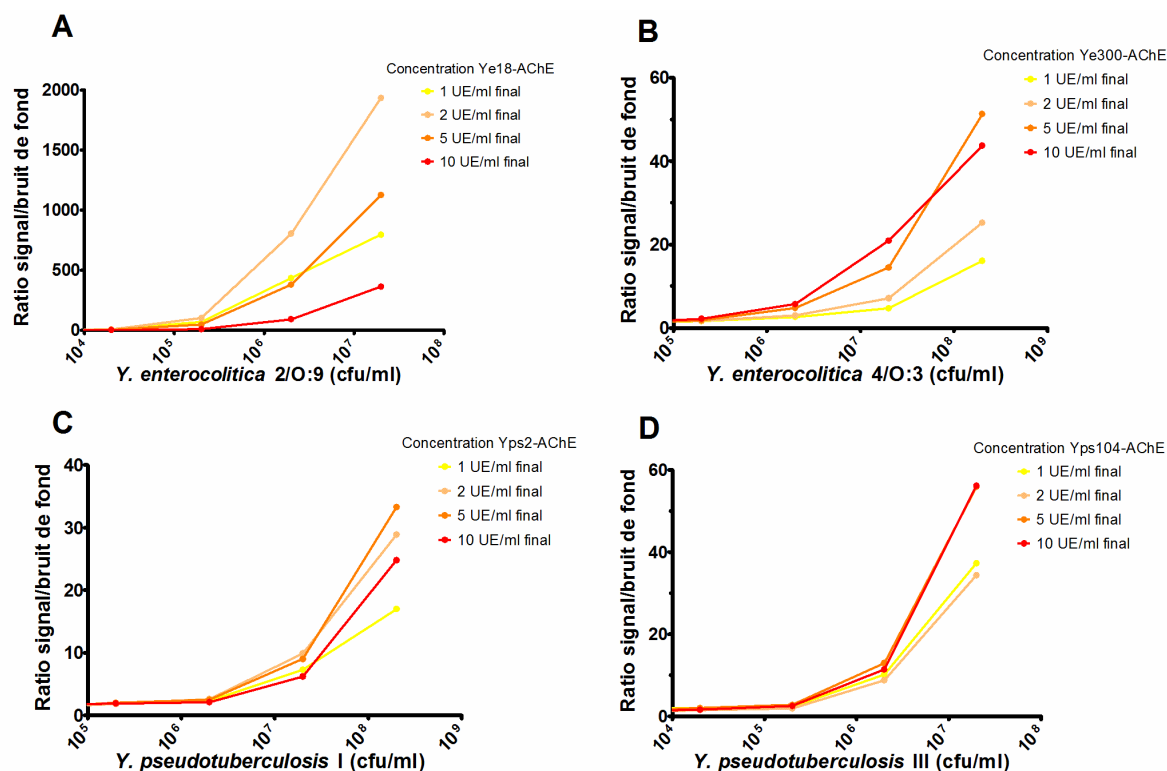


Figure 47 : Détermination de la concentration optimale en anticorps traceur couplé à l'AChE pour chaque série. (A) ELISA sandwich Ye4/Ye18-AChE avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) ELISA sandwich Ye300/Ye300-AChE avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) ELISA sandwich Yps4/Yps2-AChE avec *Y. pseudotuberculosis* I. (D) ELISA sandwich Yps114/Yps104-AChE avec *Y. pseudotuberculosis* III.

1.3. La recherche du meilleur anticorps monoclonal de capture

Afin d'optimiser notre test EIA, il est nécessaire de définir l'AcM de capture permettant d'obtenir la meilleure sensibilité. Un ELISA sandwich est donc effectué, avec des dilutions en série des *Yersinia* d'intérêt en utilisant les quatre traceurs Ye18-AChE, Ye300-AChE, Yps2-AChE et Yps104-AChE aux concentrations optimales définies (2 ou 5 UE/ml), avec les AcMs de capture de chaque série ayant donné un fort signal lors des analyses combinatoires.

Ainsi, en association avec le traceur Ye18-AChE, l'AcM de capture Ye4 permet d'obtenir la meilleure sensibilité (Y.e 2/O:9) (figure 48A et tableau 27A). Pour le traceur Ye300-AChE, c'est l'AcM Ye300 (Y.e 4/O:3) (figure 48B et tableau 27B). Pour le traceur Yps2-AChE, ce sont les AcMs Yps2 et Yps9 qui permettent l'obtention des signaux les plus intenses (Y.ps I) (figure 48C et tableau

27C). L'AcM Yps2 donnant le moins de bruit de fond, il est sélectionné comme anticorps de capture. Pour le traceur Yps104-AChE, c'est l'AcM Yps108 (Y.ps III) (figure 48D et tableau 27D).

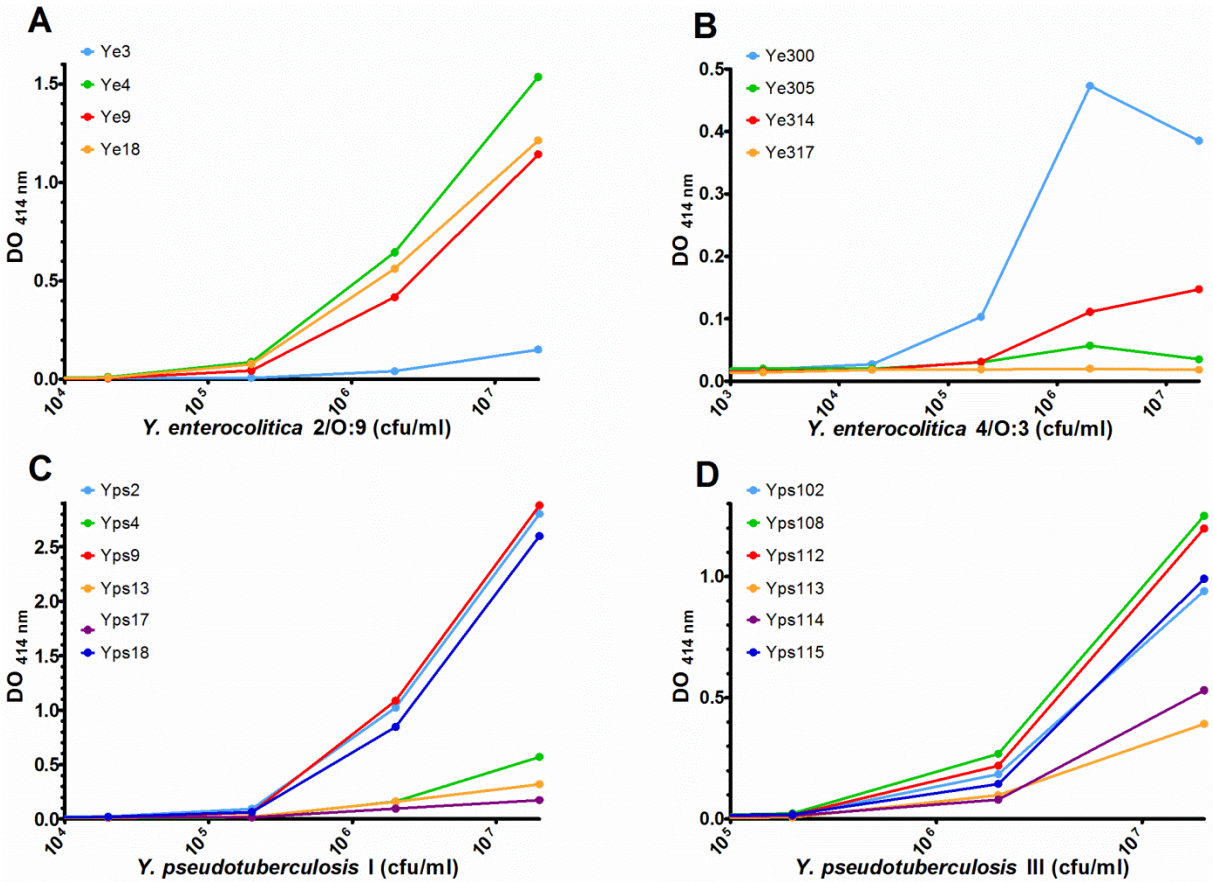


Figure 48 : Détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série. (A) ELISA sandwich avec le traceur Ye18-AChE (*Y. enterocolitica* 2/O:9). (B) ELISA sandwich avec le traceur Ye300-AChE (*Y. enterocolitica* 4/O:3). (C) ELISA sandwich avec le traceur Yps2-AChE (*Y. pseudotuberculosis* I). (D) ELISA sandwich avec le traceur Yps104-AChE (*Y. pseudotuberculosis* III).

A

<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9	Anticorps de capture			
Ye18-AChE	Ye3	Ye4	Ye9	Ye18
2 x 10 ⁵ cfu/mL	1,0	22,4	8,3	15,6
2 x 10 ⁴ cfu/mL	1,0	3,0	1,2	1,9
2 x 10 ³ cfu/mL	1,0	1,5	1,0	1,0
2 x 10 ² cfu/mL	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0

B

<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	Anticorps de capture			
Ye300-AChE	Ye300	Ye305	Ye314	Ye317
2 x 10 ⁶ cfu/mL	5,1	1,2	1,4	1,0
2 x 10 ⁵ cfu/mL	1,4	1,0	1,0	1,0
2 x 10 ⁴ cfu/mL	0,9	1,0	1,0	1,0
2 x 10 ³ cfu/mL	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0

C

<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	Anticorps de capture					
Yps2-AChE	Yps2	Yps4	Yps9	Yps13	Yps17	Yps18
2 x 10 ⁵ cfu/mL	7,3	1,6	4,7	1,3	1,1	2,7
2 x 10 ⁴ cfu/mL	1,9	1,2	1,0	1,0	1,3	1,0
2 x 10 ³ cfu/mL	2,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
2 x 10 ² cfu/mL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

D

<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	Anticorps de capture					
Yps104-AChE	Yps102	Yps108	Yps112	Yps113	Yps114	Yps116
2 x 10 ⁶ cfu/mL	1,9	9,0	8,6	2,0	3,4	1,2
2 x 10 ⁵ cfu/mL	1,1	2,0	3,0	1,2	2,2	1,0
2 x 10 ⁴ cfu/mL	1,0	1,3	1,0	1,0	1,0	1,0
2 x 10 ³ cfu/mL	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0

Tableau 27 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination du meilleur anticorps de capture pour chaque série. (A) ELISA sandwich avec le traceur Ye18-AChE (*Y. enterocolitica* 2/O:9). (B) ELISA sandwich avec le traceur Ye300-AChE (*Y. enterocolitica* 4/O:3). (C) ELISA sandwich avec le traceur Yps2-AChE (*Y. pseudotuberculosis* I). (D) ELISA sandwich avec le traceur Yps104-AChE (*Y. pseudotuberculosis* III).

A présent, les quatre tests immuno-enzymatiques sont nommés EIA Y.e 2/O:9, EIA Y.e 4/O:3, EIA Y.ps I et EIA Y.ps III.

1.4. L'optimisation des conditions d'incubation

Le protocole de l'EIA est optimisé afin de définir les conditions expérimentales permettant d'obtenir la meilleure sensibilité : en particulier, une étape de centrifugation après le dépôt de l'échantillon à analyser et la durée d'incubation entre les AcMs et cet échantillon sont testés (figure 49 et tableau 28). Pour les quatre EIAs, les paramètres optimaux permettant d'obtenir les meilleures sensibilités sont une centrifugation suivie d'une incubation de 3 h (courbes bleues foncées dans la figure 49). Les signaux obtenus pour les EIAs réalisés avec une incubation de 3 h sans centrifugation (courbes bleues claires dans la figure 49) et pour les EIAs réalisés avec une centrifugation et 30 min d'incubation (courbes rouges dans la figure 49) sont semblables. Avec de faibles concentrations de bactéries (inférieures à 10⁵ cfu/mL), les ratios signal/bruit de fond des quatre EIAs sont toujours meilleurs lorsque la condition centrifugation et incubation de 3 h est choisie (tableau 28).

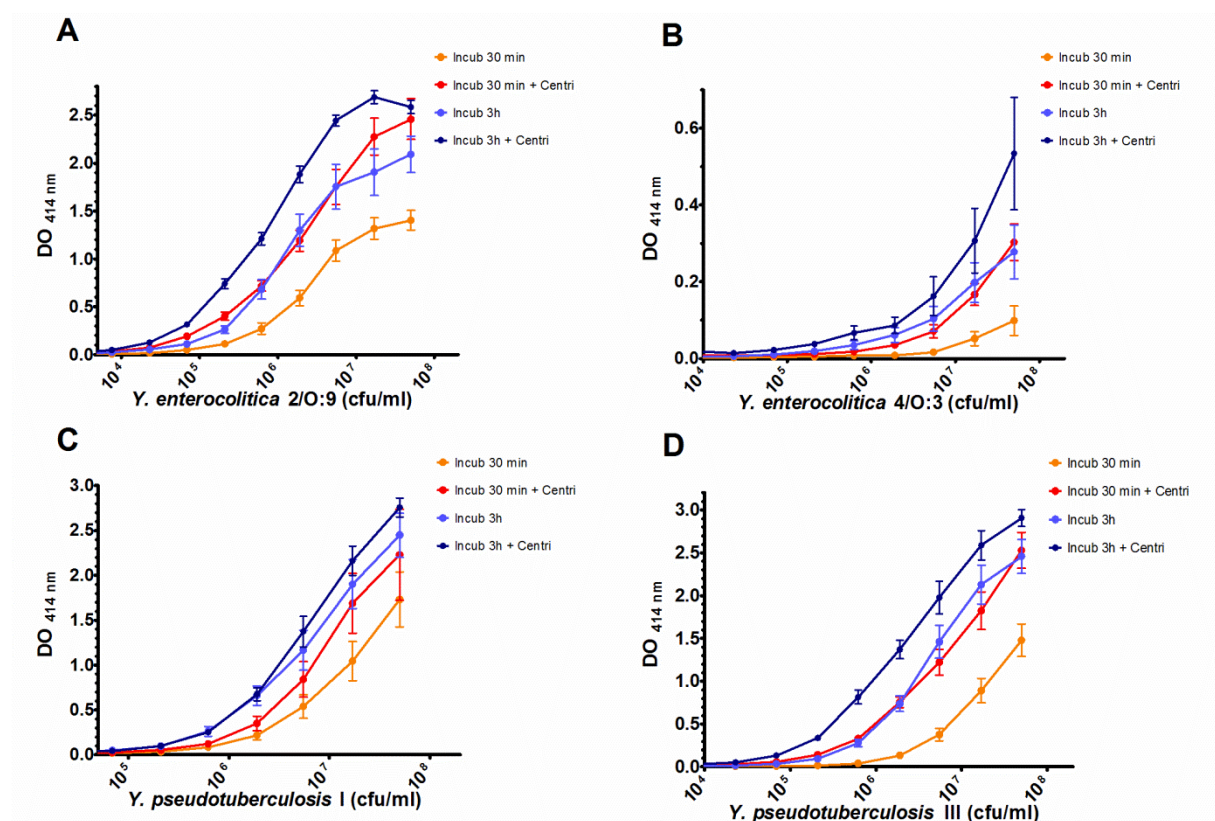


Figure 49 : Détermination des conditions optimales des EIAs. (A) EIA Y.e 2/O:9. (B) EIA Y.e 4/O:3. (C) EIA Y.ps I. (D) EIA Y.ps III.

	Incub 30 min	Incub 30 min + centri	Incub 3 h	Incub 3 h + centri
EIA Y.e 2/O:9				
$6,9 \times 10^4$ cfu/mL	11,9	18,8	6,2	75,7
$2,3 \times 10^4$ cfu/mL	4,2	7,3	3,0	30,3
$7,6 \times 10^3$ cfu/mL	2,0	3,3	1,3	11,4
$2,5 \times 10^3$ cfu/mL	1,1	1,7	0,5	5,6
$8,5 \times 10^2$ cfu/mL	1,0	1,1	0,4	3,3
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0
EIA Y.e 4/O:3				
$6,2 \times 10^5$ cfu/mL	3,2	3,1	9,9	12,1
$2,0 \times 10^5$ cfu/mL	1,9	2,1	5,3	6,8
$6,9 \times 10^4$ cfu/mL	1,3	1,6	2,9	4,0
$2,3 \times 10^4$ cfu/mL	1,0	1,4	1,6	2,6
$7,6 \times 10^3$ cfu/mL	1,0	1,5	1,3	3,2
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0
EIA Y.ps I				
$6,2 \times 10^5$ cfu/mL	9,2	8,7	18,9	22,6
$2,0 \times 10^5$ cfu/mL	3,8	3,8	7,1	8,9
$6,9 \times 10^4$ cfu/mL	2,3	1,9	3,5	3,9
$2,3 \times 10^4$ cfu/mL	1,7	1,4	2,2	2,3
$7,6 \times 10^3$ cfu/mL	1,5	1,3	1,7	1,7
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0

EIA Y.ps III				
2,0 x 10 ⁵ cfu/mL	4,3	11,9	13,2	38,9
6,9 x 10 ⁴ cfu/mL	2,3	5,0	5,0	15,2
2,3 x 10 ⁴ cfu/mL	2,1	2,5	2,5	6,0
7,6 x 10 ³ cfu/mL	2,2	1,5	1,6	3,5
2,5 x 10 ³ cfu/mL	1,3	1,4	1,5	2,2
Tampon d'analyse	1,0	1,0	1,0	1,0

Tableau 28 : Ratio signal/bruit de fond pour la détermination des conditions optimales de l'EIA Y.e 2/O:9, l'EIA Y.e 4/O:3, l'EIA Y.ps I et l'EIA Y.ps III

Pour la suite, ce sont les conditions centrifugation et incubation de 3 h qui sont choisies.

2. L'EIA optimisé

Toutes les optimisations effectuées permettent d'obtenir un test EIA réalisable en 3 h 30 (3 h d'incubation avec l'anticorps traceur couplé à l'ACHé et 30 min de révélation) au lieu de 20 h 30 pour le format initial (18 h d'incubation avec l'anticorps traceur couplé à la biotine, 2 h d'incubation avec la streptavidine-ACHé et 30 min de révélation).

2.1. L'influence de la température

Pour évaluer une possible influence de la température de croissance des bactéries sur la sensibilité du test EIA, des dilutions en séries des souches d'intérêt de *Yersinia* cultivées à deux température (28°C et 37°C) sont réalisées.

De meilleurs signaux sont obtenus lorsque la température de croissance de *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* III est de 28°C (figure 50). Cependant, la différence de signal n'est pas significative pour l'EIA Y.e 4/O:3. Une température de croissance de 37°C pour *Y. pseudotuberculosis* I est en revanche plus favorable.

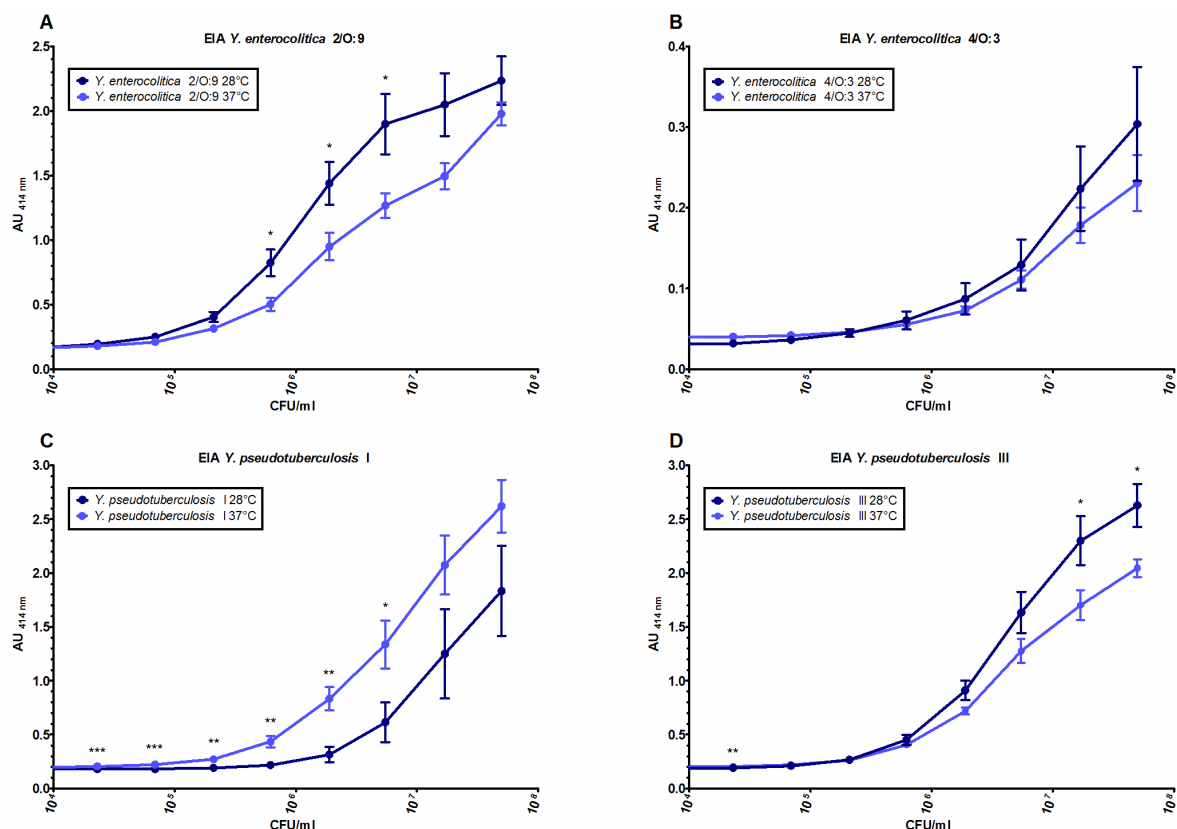


Figure 50 : Impact de la température de croissance des bactéries sur la sensibilité des EIAs optimisés. Les *Yersinia* sont cultivées à 28°C (courbe bleue foncée) ou à 37°C (courbe bleue claire). (A) EIA Y.e 2/O:9. (B) EIA Y.e 4/O:3. (C) EIA Y.ps I. (D) EIA Y.ps III. Chaque mesure est effectuée en duplicats et trois fois indépendamment. Les astérisques indiquent les signaux significativement différents : * = $P < 0.05$; ** = $P < 0.01$; and *** = $P < 0.001$ (La valeur-p indiquée est obtenue par le test t de Student non apparié).

2.2. L'évaluation de la spécificité

La spécificité des EIAs est vérifiée en utilisant une forte concentration de différentes entérobactéries (5×10^7 cfu/mL) cultivées à leur température de détection optimale définie précédemment.

La spécificité pour les *Yersinia* d'intérêt vis à vis d'autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*) est tout d'abord vérifiée (figure 51). Un signal optique est obtenu pour tous les EIAs réalisés. Seul l'EIA Y.ps I, présente une légère réaction croisée avec la souche *E. coli* BL21 (<2%). Les trois autres EIAs sont spécifiques de leurs souches d'intérêt. Cependant, l'EIA Y.e 4/O:3 fournit un signal inférieur comparé aux autres EIAs, indiquant une possible différence de sensibilité ou un plafonnement du signal autour de 500 mDO.

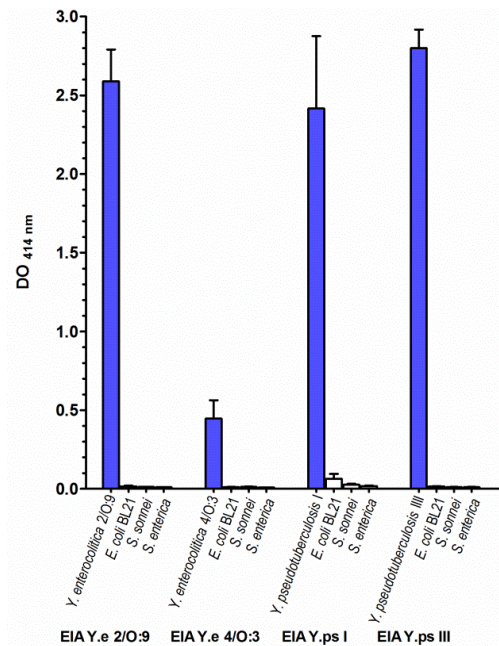


Figure 51 : Spécificité de l'EIA optimisé pour les *Yersinia* d'intérêt comparées à d'autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*). Les *Yersinia* sont cultivées à 28°C pour les EIAs Y.e 2/O:9, Y.e 4/O:3 et Y.ps III, et à 37°C pour l'EIA Y.ps I afin d'obtenir un signal le plus fort possible. Les autres entérobactéries sont cultivées à 37°C. Les bactéries sont utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Chaque mesure est effectuée en duplicats et trois fois indépendamment.

Dans un deuxième temps, la comparaison de la spécificité entre différents biosérotypes de *Y. enterocolitica* (2/O:9 ou 4/O:3 contre 1A, 1B, 2/O:5,27) et différents sérotypes de *Y. pseudotuberculosis* (I, III, V) est réalisée (figure 52). Seul l'EIA *Y. pseudotuberculosis* I, présente une légère réaction croisée avec des souches de *Yersinia* non spécifiques (<5% avec *E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*). Les trois autres EIAs sont totalement spécifiques de leur souche d'intérêt.

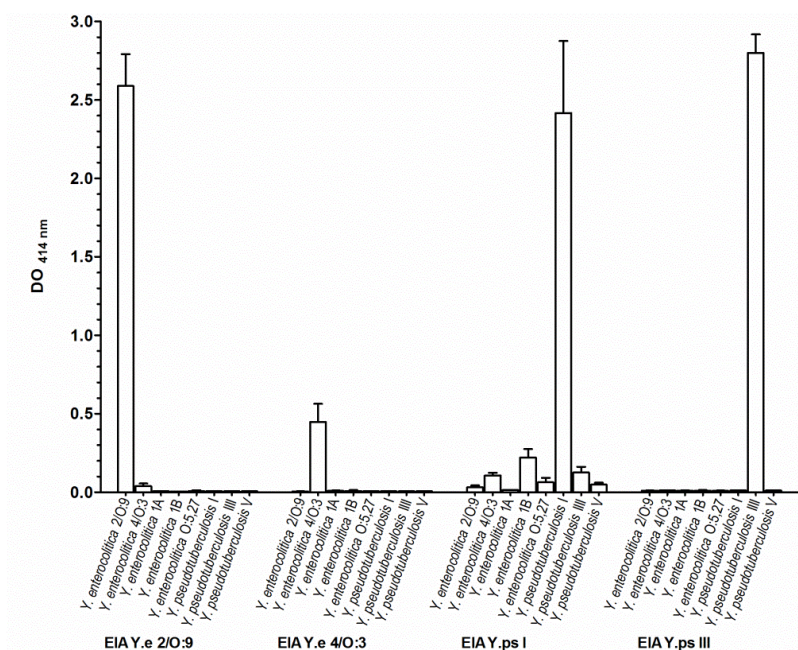


Figure 52 : Spécificité de l'EIA optimisé. Les *Yersinia* sont cultivées à 28°C pour les EIAs Y.e 2/O:9, Y.e 4/O:3 et Y.ps III, et à 37°C pour l'EIA Y.ps I afin d'obtenir un signal le plus fort possible. Toutes les bactéries sont utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Chaque mesure est effectuée en duplicats et trois fois indépendamment.

2.3. L'évaluation de la sensibilité

La fonction « five-parameter logistic fit (5-PL) » (GraphPad Prism 5) est utilisée pour calculer et tracer la courbe standard permettant de calculer la LoD qui correspond à la concentration en bactéries (cfu/mL) produisant un signal correspondant à la moyenne du signal non spécifique additionnée de trois fois la déviation standard de cette moyenne.

Tous les tests EIAs permettent la détection des *Yersinia* entéropathogènes dans une gamme de 10^4 - 10^5 cfu/mL. De plus, les LoDs calculées pour chaque EIA sont proches, quelle que soit la température de croissance (tableau 29). Il est intéressant de noter que la procédure optimisée permet d'obtenir un gain de sensibilité (d'au moins 14 fois) par rapport à la procédure initiale.

	Tampon EIA			
	28°C		37°C	
<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9	$3,4 \times 10^3$	$\pm 0,5 \times 10^3$	$4,9 \times 10^3$	$\pm 0,8 \times 10^3$
<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	$7,8 \times 10^4$	$\pm 1,6 \times 10^4$	$1,4 \times 10^5$	$\pm 0,6 \times 10^5$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	$2,0 \times 10^5$	$\pm 0,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^3$	$\pm 0,2 \times 10^3$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	$1,9 \times 10^4$	$\pm 1,0 \times 10^4$	$1,1 \times 10^4$	$\pm 0,4 \times 10^4$

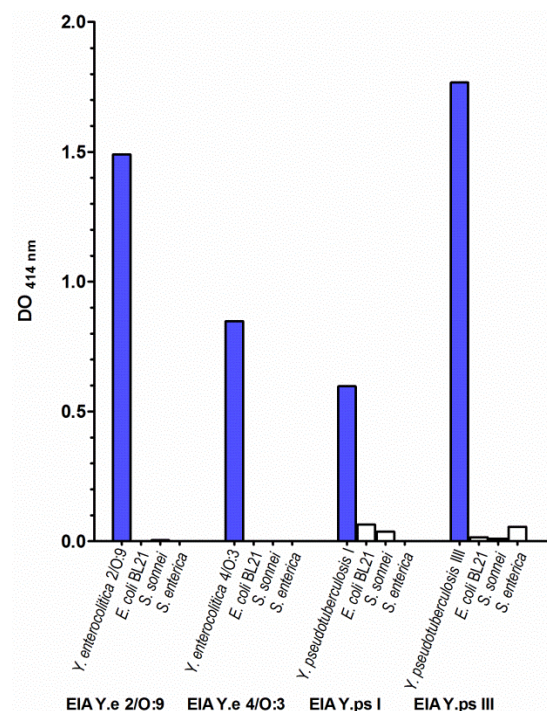
Tableau 29 : Limites de détection en cfu/mL de l'EIA pour les *Yersinia* cultivées à 28°C et 37 °C et diluées en tampon EIA. Chaque mesure est effectuée en duplicats et trois fois indépendamment.

Il est à noter que l'EIA *Y.e* 4/O:3 offre des sensibilités comparables aux autres EIA même si le signal optique obtenu est plus faible que les autres EIAs à de fortes concentrations bactériennes (figure 51). Il semble donc que le faible signal observé précédemment soit dû à un plafonnement de celui-ci.

3. L'EIA avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement

Afin d'évaluer l'effet d'une matrice plus proche de la réalité sur la sensibilité des tests, les EIAs sont testés avec un échantillon de fèces artificiellement contaminé. Les spécificités et les sensibilités sont déterminées comme précédemment en utilisant les mêmes souches. Comme avec le tampon EIA, un signal spécifique est obtenu pour la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. pseudotuberculosis* I et *Y. pseudotuberculosis* III avec leur EIA respectif (figure 53).

A



B

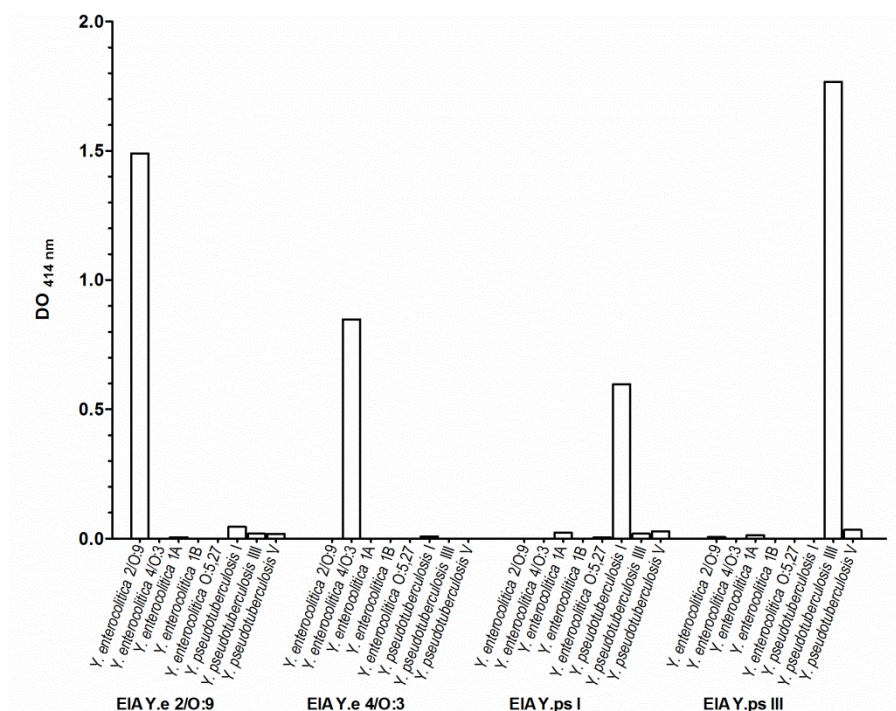


Figure 53 : Spécificité de l'EIA avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement. Les *Yersinia* sont cultivées à 28°C pour les EIAs Y.e 2/O:9, Y.e 4/O:3 et Y.ps III, et à 37°C pour l'EIA Y.ps I afin d'obtenir un signal le plus fort possible. Les autres entérobactéries sont cultivées à 37°C. Les bactéries sont utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Chaque mesure est effectuée en duplicats (A) Spécificité pour les *Yersinia* d'intérêt comparées à d'autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*). (B) Spécificité pour les *Yersinia* d'intérêt comparées à d'autres *Yersinia*.

La température de croissance des *Yersinia* a la même influence sur les LoDs (tableau 30). Pour l'EIA Y.e 2/O:9 et de l'EIA Y.ps I, les LoDs en fèces sont augmentées d'au moins un log lorsque les bactéries sont cultivées à 37°C (tableau 30) en comparaison avec ce qui est obtenu en tampon d'analyse. Pour les autres tests et températures de culture, l'effet « matrice fèces » observé est

inférieur à un facteur 10. Seule la LoD en fèces de l'EIA Y.e 4/O:3 est meilleure lorsque les bactéries sont cultivées à 28°C. Cependant, la LoD du même EIA réalisé en tampon d'analyse possède un écart type élevé ($7,8 \times 10^4 \pm 1,6 \times 10^4$ cfu/mL).

De plus, ces résultats ne sont obtenus qu'à partir d'une seule expérience, et ne peuvent donc qu'indiquer des tendances.

	Fèces	
	28°C	37°C
<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9	$7,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^5$
<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	$1,4 \times 10^4$	$1,6 \times 10^5$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	$1,6 \times 10^5$	$4,2 \times 10^4$
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	$5,2 \times 10^4$	$5,4 \times 10^4$

Tableau 30 : Limites de détection en cfu/mL de l'EIA pour *Yersinia* cultivée à 28°C et 37 °C dans les fèces artificiellement contaminées. Chaque mesure est effectuée en duplicats.

4. L'analyse des antigènes reconnus par les anticorps par la technique de western blot

Afin de déterminer si les antigènes reconnus par les AcMs utilisés dans l'EIA sont de nature protéique ou autre, les échantillons bactériens sont traités ou non à la protéinase K avant le western blot (figure 54). L'analyse des immuno-blots montre que seul l'AcM Yps2 sur l'échantillon de *Y. pseudotuberculosis* I reconnaît une bande autour de 70 kDa sensible à la protéinase K (lignes 7 et 8). Ceci indique que l'AcM Yps2 se lie à un épitope protéique. Pour les AcMs Ye4 et Ye18 sur l'échantillon de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et Ye300 sur l'échantillon de *Y. enterocolitica* 4/O:3, le traitement à la protéinase K n'induit pas de modifications claires de la reconnaissance. Pour les AcMs Yps104 et Yps108 sur l'échantillon de *Y. pseudotuberculosis* III, seule une bande de haut poids moléculaire (autour de 100 kDa) apparaît légèrement sensible à la protéinase K avec une diminution du signal et un léger décalage du poids moléculaire autour de 80 kDa (lignes 9 à 12).

De plus, sur les immuno-blots utilisant Ye4, Ye18 et Ye300, un profil typique de la présence de LPS est observé (lignes 1 à 6) (313). Pour les AcMs Yps104 et Yps108, un autre profil est observé avec un signal fort correspondant au LPS et un signal moins fort pour des bandes de poids moléculaires plus élevés, correspondant probablement aux longues chaînes de LPS (lignes 9 à 12) (84). Tous ces échantillons présentent le profil caractéristique en « smear » du LPS, ne sont pas ou très peu sensibles à la protéinase K, indiquant que ces AcMs reconnaissent probablement le LPS de leur souche d'intérêt de *Yersinia*.

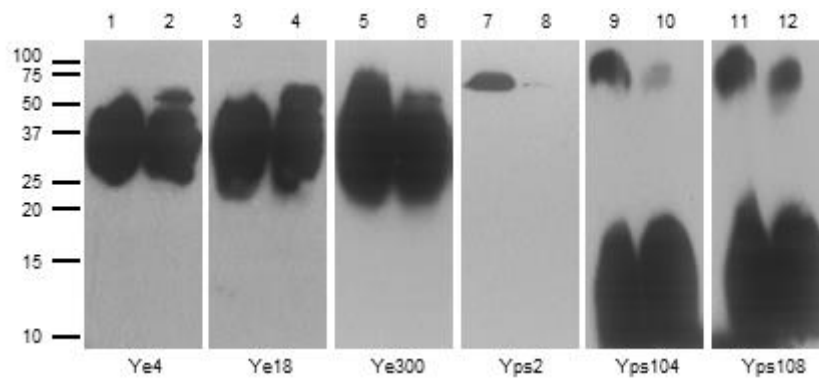


Figure 54 : Reconnaissance des épitopes protéiques et lipopolysaccharidiques par les anticorps anti-*Yersinia* utilisés pour l'EIA. Western blot avec Ye4 (lignes 1 et 2) et Ye18 (lignes 3 et 4) utilisant *Y. enterocolitica* 2/O:9 (10^7 cfu/puits). Western blot avec Ye300 (lignes 5 et 6) utilisant *Y. enterocolitica* 4/O:3 (10^7 cfu/puits). Western blot avec Yps2 (lignes 7 et 8) utilisant *Y. pseudotuberculosis* I (10^7 cfu/puits). Western blot avec Yps104 (lignes 9 et 10) et Yps108 (lignes 11 et 12) utilisant *Y. pseudotuberculosis* III (10^8 cfu/puits). Les échantillons bactériens lignes 2, 4, 6, 8, 10 et 12 sont traités à la protéinase K avant leurs dépôts. L'échelle sur la gauche indique les poids moléculaires du standard.

5. Bilan et discussion

Nous avons développé un EIA très sensible dont la LoD est comprise entre 1.2×10^3 et 2.0×10^5 cfu/mL pour la détection de *Y. enterocolitica* biosérotypes 2/O:9 et 4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* sérotypes I et III.

La première étape de l'optimisation de l'EIA était de réaliser un anticorps traceur directement couplé à l'AChE afin de diminuer le nombre d'étapes nécessaires et le temps d'analyse, puis de déterminer le meilleur anticorps de capture. De plus, l'utilisation d'anticorps traceurs couplés à l'AChE permet de diminuer le bruit de fond pour tous les EIAs et de gagner en sensibilité (d'un log pour l'EIA Y.e 2/O:9). Ensuite, la réalisation des tests EIAs avec différents paramètres pour l'étape d'incubation a permis de définir un protocole optimisé (centrifugation à $1\,000 \times g$ durant 5 min puis incubation durant 3 h). Ce protocole permet un gain de sensibilité d'un à trois logs dans les meilleures conditions par rapport à l'EIA réalisé avec un anticorps traceur biotinylé et une incubation sur la nuit.

Il apparaît que la température de croissance des *Yersinia* a une influence sur la sensibilité de notre EIA. Pour l'EIA détectant *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* III, de meilleurs signaux sont obtenus lorsque les bactéries sont cultivées à 28°C plutôt que 37°C, même si cette différence n'est pas significative pour l'EIA Y.e 4/O:3. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que les AcMs utilisés dans ces EIAs reconnaissent le LPS, qui est plus fortement produit par les *Yersinia* entéropathogènes à 28°C *in vitro* (314). Pour l'EIA détectant *Y. pseudotuberculosis* I, le signal et la LoD sont meilleurs lorsque les bactéries sont cultivées à 37°C. Les AcMs utilisés dans cet EIA ciblent une protéine et la température de 37°C augmenterait probablement son expression *in vitro*.

Lorsque l'EIA est effectué avec des fèces, les LoDs sont pas ou peu modifiées, à l'exception de la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et de *Y. pseudotuberculosis* I qui sont 20 à 35 fois moins sensibles quand les bactéries sont cultivées à 37°C.

III. Les tests immuno-chromatographiques (tests bandelettes)

Afin de réaliser un test de diagnostic plus rapide et simple d'utilisation que l'EIA, un test immuno-chromatographique est développé. Bien que moins coûteux, plus rapide et simple que l'EIA, ce test présente généralement l'inconvénient d'une plus faible sensibilité. Toutes les combinaisons d'AcMs ayant donné un signal spécifique dans le test EIA sont réévaluées pour le développement des tests bandelettes.

1. L'analyse combinatoire des bandelettes

1.1. La détermination des combinaisons d'anticorps monoclonaux et leur spécificité

Comme pour le test EIA, la spécificité du test immuno-chromatographique est déterminée à plusieurs niveaux :

- la spécificité pour le genre *Yersinia* comparé à d'autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*),
- la spécificité d'espèce entre les deux *Yersinia* entéropathogènes (*Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis*),
- la spécificité entre différents biosérotypes de *Y. enterocolitica* (2/O:9 ou 4/O:3 contre 1A 1B, 2/O:5,27) et différents sérotypes de *Y. pseudotuberculosis* (I, III, V).

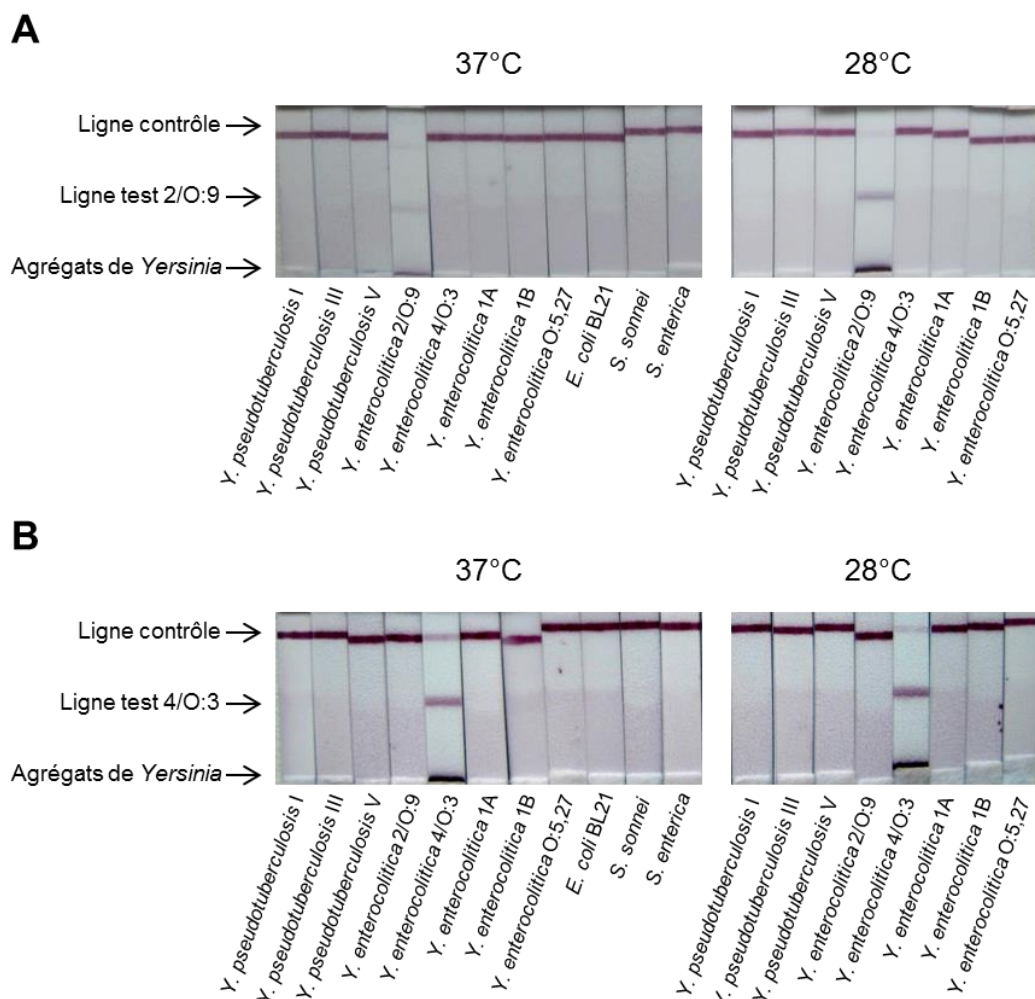
Toutes les bactéries sont utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL soit 5×10^6 cfu/bandelette. De plus, 8 AcMs de la série Yp (obtenus précédemment au laboratoire après immunisation avec *Y. pestis*) reconnaissant aussi *Y. pseudotuberculosis* sont aussi évalués. Ainsi, les combinaisons d'AcMs reconnaissant spécifiquement la souche d'intérêt (excepté les AcMs Yp qui par définition reconnaissent aussi *Y. pestis*) sont sélectionnées afin de déterminer leur sensibilité. La sensibilité est évaluée avec des dilutions en série de la souche d'intérêt de *Yersinia*. Pour les AcMs Ye, les combinaisons testées sont décrites dans le tableau 31 et seul l'AcM Ye12 donne un signal visuel non spécifique. Dans la série Ye3, seuls les AcMs Ye300 et Ye314 sont testés en traceurs et immobilisés sur bandelettes. Ces combinaisons donnent toutes un signal visuel positif pour la détection de *Y. enterocolitica* 4/O:3. Pour les AcMs Yps et Yp, de nombreuses combinaisons sont testées (tableau 32) mais peu donnent un signal spécifique de *Y. pseudotuberculosis* I. Pour la série Yps1, seuls les AcMs Yps104 et Yps 114 sont testés en traceurs avec tous les autres AcMs

immobilisés des bandelettes et donnent toujours un signal visuel spécifique pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* III.

Au final, les meilleures combinaisons d'AcMs sont les suivantes :

- pour la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 : Ye4/Ye18* (bandelette 2/O:9, figure 55A et tableau 31),
- pour la détection de *Y. enterocolitica* 4/O:3 : Ye300/Ye300* (bandelette 4/O:3, figure 55B),
- pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* III : Yps103/Yps104* (figure 55C).

La combinaison Yp7/Yp7* permet la détection de *Y. pseudotuberculosis* sérotypes I (tableau 32), mais aussi des sérotypes II, IV et V simultanément (figure 55D), utile si l'on souhaite réaliser un test unique pour la détection de cinq sérotypes de *Y. pseudotuberculosis*. Les deux dernières paires d'AcMs sont alors combinées pour réaliser une même bandelette (appelée bandelette Ypseudo).



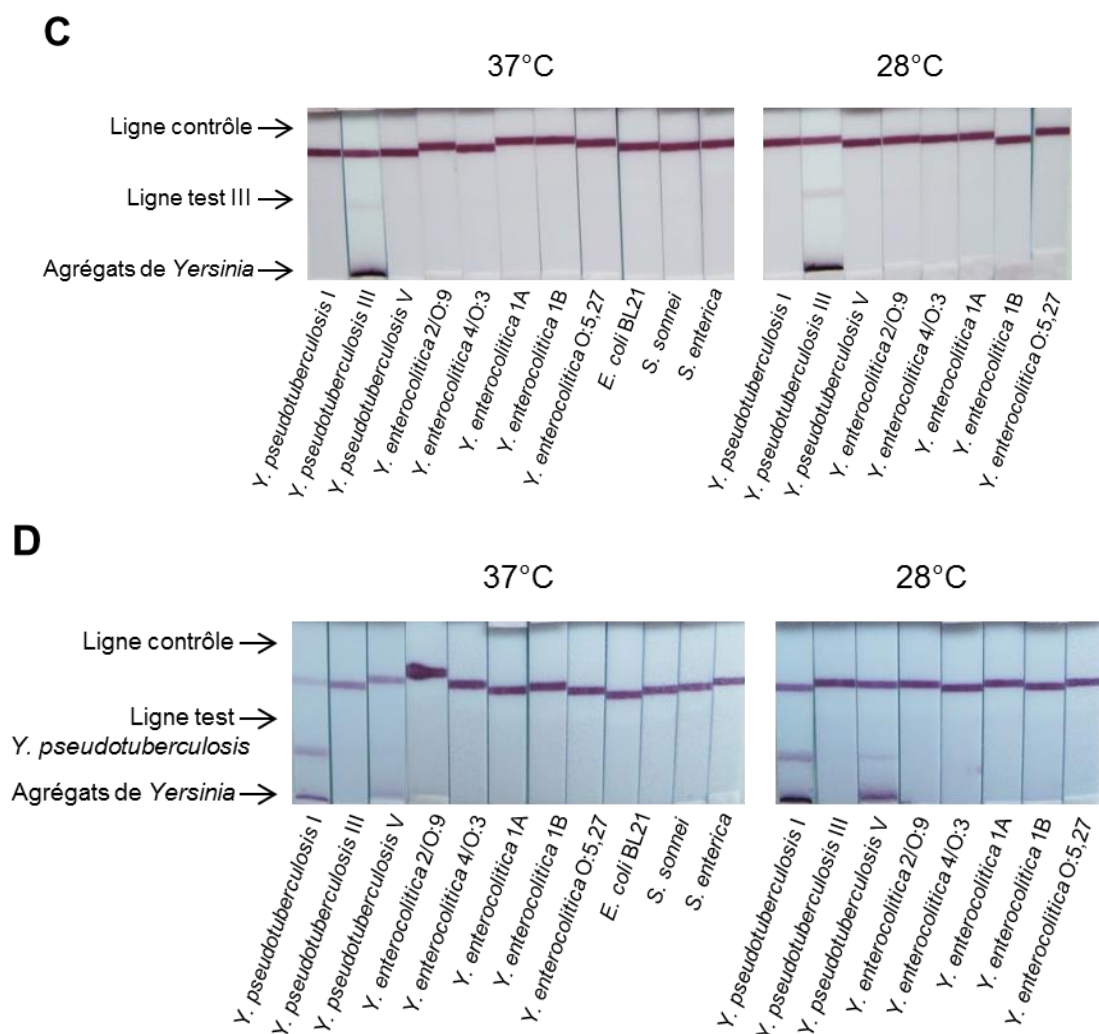


Figure 55 : Spécificités des tests immuno-chromatographiques. Bactéries cultivées à 28°C ou 37°C et utilisées à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Lecture visuelle à 30 min. (A) Bandelette 2/O:9. (B) Bandelettes 4/O:3. (C) Bandelettes Yps103 avec le traceur Yps104*. (D) Bandelettes Yp7 avec le traceur Yp7.

		Anticorps traceur					
		Ye4	Ye7	Ye9	Ye12	Ye14	Ye18
Anticorps de capture	Ye4						
	Ye7						
	Ye9						
	Ye12						
	Ye14						
	Ye18						

Tableau 31 : Résultats de l'analyse combinatoire en bandelettes des anticorps Ye avec *Y. enterocolitica* 2/O:9 produisant l'injectisome et le surnageant de culture des bactéries. Cases vertes : bandelettes positives pour la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Les cases avec une croix indiquent la détection de bactéries non spécifiques.

		Anticorps traceur													
		Yps1	Yps2	Yps3	Yps4	Yps8	Yps9	Yps11	Yps12	Yps18	Yp4	Yp7	Yp11	Yp18	
Anticorps de capture	Yps1														
	Yps2														
	Yps3														
	Yps4														
	Yps8														
	Yps9														
	Yps11														
	Yps12														
	Yps13														
	Yps16														
	Yps18														
	Yp4														
	Yp5														
	Yp7														
	Yp11														
	Yp12														
	Yp13														
	Yp15														
Yp18															

Tableau 32 : Résultats de l'analyse combinatoire en bandelettes des anticorps Yps et Yp avec *Y. pseudotuberculosis* I. Cases vertes: bandelettes positives pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* I à la concentration de 5×10^7 cfu/mL. Cases grises : bandelettes négatives pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* I à la concentration de 5×10^7 cfu/mL Cases blanches : test bandelette non réalisés. Les cases avec une croix indiquent la détection de bactéries non spécifiques.

Ces différentes bandelettes sont aussi spécifiques que l'EIA optimisé et aucune réactivité croisée n'est observée avec les autres entérobactéries (*E. coli*, *S. sonnei* et *S. enterica*) ou les *Yersinia* non spécifiques testées (en fonction des bandelettes : *Y. enterocolitica* 2/O:9, 4/O:3, 1A 1B, 2/O:5,27, et *Y. pseudotuberculosis* I, III et V).

De plus, comme le LPS de *Y. enterocolitica* 2/O:9 possède des antigènes communs à celui du genre *Brucella* (84), des analyses supplémentaires sont menées afin de rechercher d'éventuelles réactions croisées. Mais aucun des trois tests bandelettes ne reconnaît les souches de *B. abortus* et *B. melitensis* testées (figure 56 pour la bandelette 2/O:9).

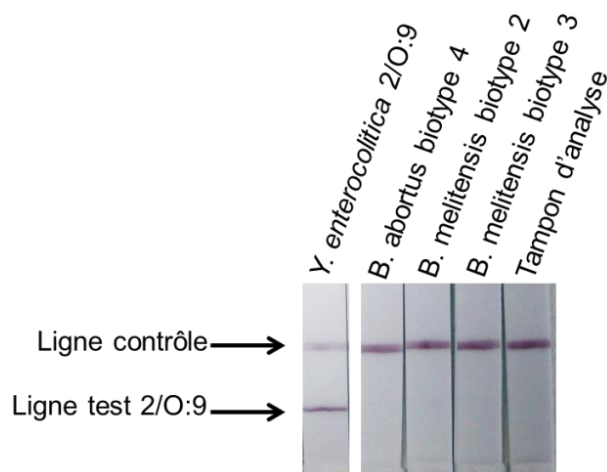
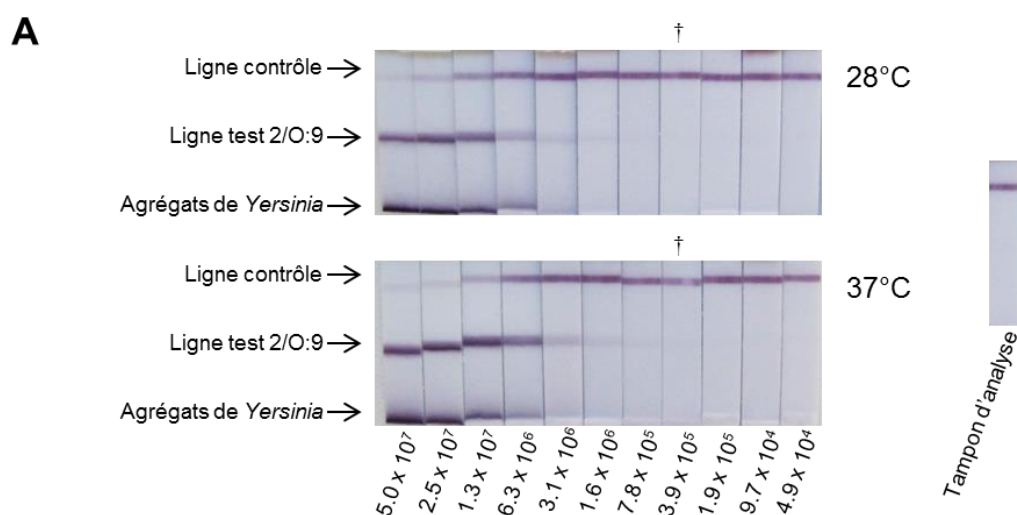


Figure 56 : Spécificité du test bandelette 2/O:9 vis-à-vis de différentes souches de *Brucella*. Concentration des bactéries : 5×10^7 cfu/mL. Lecture visuelle à 30 min.

1.2. La détermination de la sensibilité

Les sensibilités des différentes bandelettes sont déterminées en utilisant des dilutions en série de la souche *Yersinia* d'intérêt. La concentration la plus basse permettant d'obtenir un signal colorimétrique positif visuel perceptible est considérée comme la LoD du test bandelette.

Les quatre tests bandelettes permettent la détection des *Yersinia* entéropathogènes d'intérêt entre 10^5 et 10^6 cfu/mL. La LoD de la bandelette 2/O:9 est de 5×10^5 cfu/mL (figure 57A) et celle de la bandelette 4/O:3 est de 10^5 cfu/mL (figure 57B). Pour la bandelette Ypseudo, la LoD est de 10^5 cfu/mL pour le sérotype I (figure 57C), de 5×10^5 cfu/mL pour les sérotypes III et V (figure 57D) et de 10^6 cfu/mL pour les sérotypes II et IV.



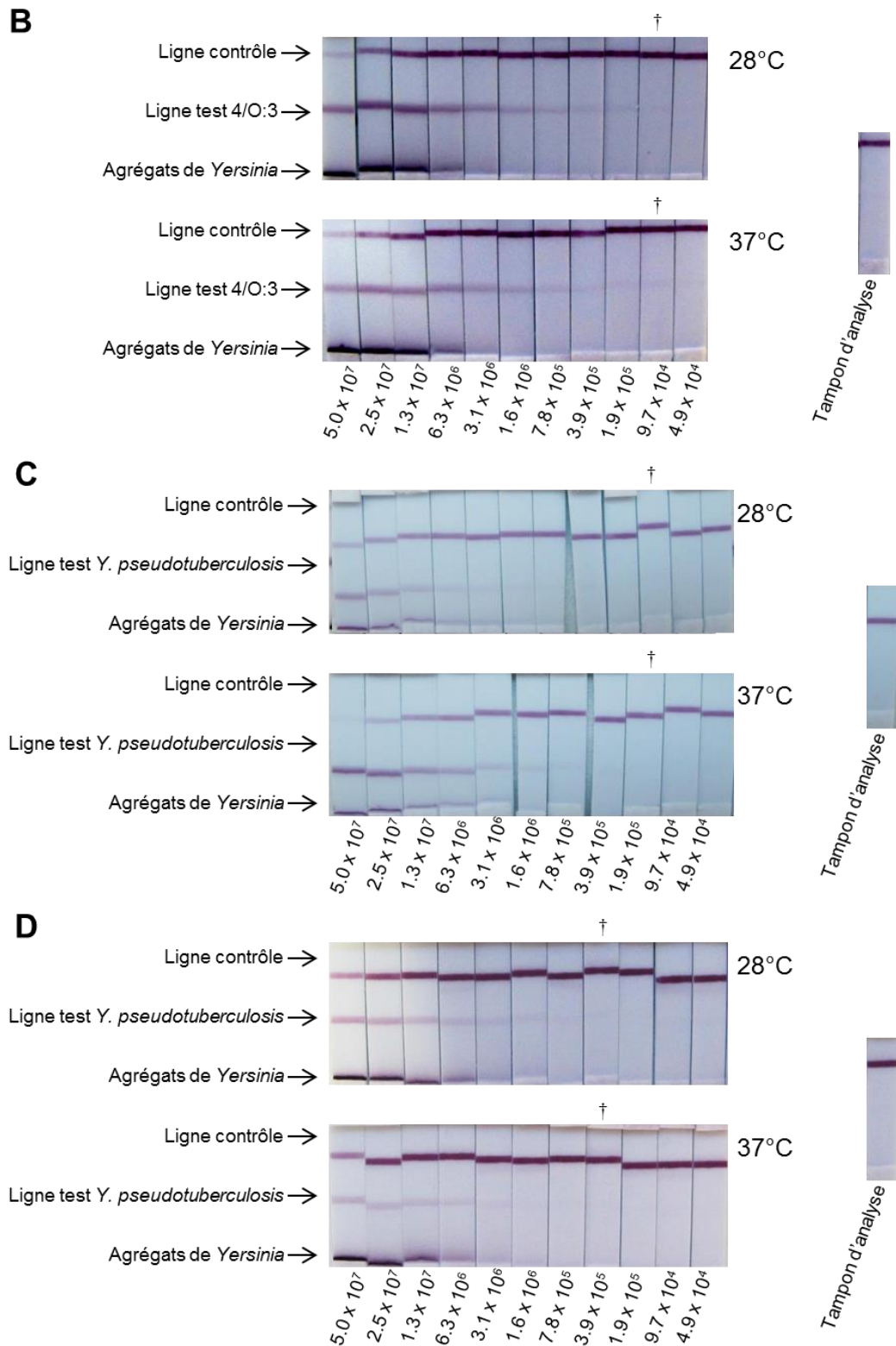


Figure 57 : Sensibilités des tests immuno-chromatographiques. Bactéries cultivées à 28°C ou 37°C et diluées en série dans du tampon d'analyse. Concentration des bactéries en cfu/mL. Lecture visuelle à 30 min. Le symbole † indique la dernière bandelette de la série ayant un signal colorimétrique visuel perceptible. (A) Bandelette 2/O:9 avec *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) Bandelettes 4/O:3 avec *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) Bandelettes Ypseudo avec *Y. pseudotuberculosis* I. (D) Bandelettes Ypseudo avec *Y. pseudotuberculosis* III.

A l'exception des bandelettes 4/O:3, les tests bandelettes sont moins sensibles que le test EIA. En effet, les bandelettes 2/O:9 sont 100 fois moins sensibles que l'EIA, les bandelettes Ypseudo sont 10 et 1000 fois moins sensibles pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* I cultivé respectivement à 28 et 37°C, et 50 fois moins sensibles pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* III. Cependant, aucune différence de sensibilité n'est observée entre les *Yersinia* cultivées à 28°C et à 37°C.

Il faut également noter que pour tous les tests bandelettes, une bande spécifique est observée sur la partie inférieure de la bandelette lorsque de fortes concentrations de bactéries sont testées. Cette bande correspond à des agrégats de *Yersinia* formés entre l'AcM traceur couplé à l'or colloïdal et les bactéries, et trop denses pour migrer le long de la membrane. À des concentrations plus faibles, l'intensité de cette bande diminue.

2. L'analyse sur un grand nombre de souches

Afin de confirmer la spécificité, tous les tests bandelettes sont réalisés avec un plus grand nombre de souches comportant des *Yersinia* d'intérêt et d'autres *Yersinia* et bactéries non spécifiques. Les souches d'intérêt sont testées à une concentration 10 fois supérieure à la LoD et les souches non spécifiques sont testées à une concentration comprise entre 5×10^6 et 5×10^7 cfu/mL. Une grande partie de ces expériences ont été réalisées par Cyril Savin au CNR de la peste et autres yersinioses.

Pour la bandelette 2/O:9, la totalité de 13 souches testées du biosérotype 2/O:9 est détectée à 10X-LoD (5×10^6 cfu/mL) alors qu'aucune des 14 souches du biosérotype 4/O:3 n'est détectée (tableau 33). Il en est de même pour les souches non spécifiques.

Pour la bandelette 4/O:3, la totalité de 14 souches testées du biosérotype 4/O:3 est détectée à 10X-LoD (5×10^6 cfu/mL) alors qu'à l'inverse, les 13 souches du biosérotype 2/O:9 ne le sont pas (tableau 33). A l'exception de la souche *Y. enterocolitica* 1A/O:3, aucune des autres *Yersinia* non spécifiques n'est détectée par ce test bandelette.

Ces résultats confirment la spécificité des tests bandelettes 4/O:3 et 2/O:9.

Espèce	Biosérotype ou caractéristique	Concentration test (cfu/mL)	Souche	Bandelette 2/O:9	Bandelette 4/O:3
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/O:9	5 x 10 ⁶	IP00383	+	-
			IP28114	+	-
			IP29717	+	-
			IP29193	+	-
			IP29476	+	-
			IP29523	+	-
			IP29944	+	-
			IP33498	+	-
			IP33617	+	-
			IP33949	+	-
			IP34070	+	-
			Ye21	+	-
			IP4294	+	-
	4/O:3	10 ⁶	IP00134	-	+
			IP08896	-	+
			IP10393	-	+
			IP28096	-	+
			IP28164	-	+
			IP28983	-	+
			IP29001	-	+
			IP29310	-	+
			IP29534	-	+
			IP29610	-	+
			IP33526	-	+
			IP33550	-	+
			IP33563	-	+
			IP34075	-	+
	2/O:5 1A/NAG 1A/O:7,8-8-8,19 1A/O:10,34 1A/O:5 1A/O:6,30-6,31 1A/O:41,42-41,43 1A/O:12,25-12,26-25,35-35 1A/NAG 1A/O:12,25-12,26 1A/O:3 1A/NAG 1B/O:8 2/O:5,27	5 x 10 ⁶	IP34120	-	-
			IP25166	-	-
			IP26014	-	-
			IP26309	-	-
			IP26618	-	-
			IP29463	-	-
			IP29465	-	-
			IP29469	-	-
			IP29845	-	-
			IP33764	-	-
			IP27875	-	+
		5 x 10 ⁷	IP33592	-	-
			CIP80.27	-	-
			CIP106676	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	I	5 x 10 ⁷	IP31629	-	-
	III		IP33434	-	-
	V		CIP55.88	-	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	5 x 10 ⁷	NA	-	-
	DH5 alpha		NA	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	Lysotype 4		CIP67,63	-	-
<i>Salmonella enterica</i>	Sérotype Typhimurium		CIP104474	-	-
<i>Brucella abortus</i>	Biotype 4		NCTC10503	-	-
<i>Brucella melitensis</i>	Biotype 2		NCTC10508	-	-
	Biotype 3		NCTC10509	-	-

Tableau 33 : Spécificités des tests immuno-chromatographiques pour la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 (bandelette 2/O:9) et *Y. enterocolitica* 4/O:3 (bandelette 4/O:3). Les bactéries du genre *Yersinia* sont cultivées à 28°C et les autres bactéries à 37°C. Cases (+) : signal visuel perceptible ; cases (-) : pas de signal visuel.

Pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* par la bandelette Ypseudo, 7 souches sur 32 du sérotype I sont détectées à 10X-LoD (10^6 cfu/mL) et ce chiffre augmente à 20 souches sur 32 pour une concentration 10 fois plus élevée (10^7 cfu/mL) (tableau 34). La totalité des souches du sérotype II (10 souches), III (11 souches), IV (10 souches) et V (11 souches) est détectée à 5×10^6 cfu/mL ou 10^7 cfu/mL (tableau 34). De plus, aucune des autres souches non spécifiques incluant *Y. enterocolitica*, *Y. similis* et *Y. wautersii* n'est détectée par la bandelette Ypseudo.

Espèce	Sérotype ou caractéristique	Concentration test (cfu/mL)	Souche	Bandelette Ypseudo
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	I	10 ⁶	IP30636	+
			IP30642	+
			IP31629	+
			IP32080	+
			IP32414	+
			IP32575	+
			IP33178	+
		10 ⁷	IP30842	+
			IP31630	+
			IP32654	+
			IP32665	+
			IP32670	+
			IP32730	+
			IP32907	+
			IP32953	+
			IP32989	+
			IP33242	+
			IP33247	+
			IP33424	+
			IP33438	+
			IP32651	-
			IP32777	-
			IP32784	-
			IP32800	-
			IP32906	-
			IP32950	-
			IP32953	-
			IP33035	-
			IP33053	-
			IP33109	-
			IP33285	-
			IP33427	-
	II	10 ⁷	IP32554	+
			IP32584	+
			IP32589	+
IP32598			+	
IP32870			+	
IP32951			+	
IP33006			+	
IP33047			+	
IP33098			+	
IP33306	+			

III		5 x 10 ⁶	IP32666	+
			IP32787	+
			IP32976	+
			IP32990	+
			IP33049	+
			IP33104	+
			IP33185	+
			IP33250	+
			IP33297	+
			IP33377	+
			IP33434	+
IV		5 x 10 ⁶	Ryster	+
			IP30103	+
			IP30290	+
			IP30291	+
			IP30298	+
			IP31411	+
			IP31830	+
			IP31833	+
			IP32687	+
			IP33234	+
V		10 ⁷	CIP55.88	+
			IP32463	+
			IP32699	+
			IP32727	+
			IP32814	+
			IP32817	+
			IP32821	+
			IP32843	+
			IP33061	+
			IP33278	+
			IP33397	+
<i>Yersinia similis</i>	O:1c	10 ⁷	Kuratani-2	-
	O:6		CIP109846	-
	O:6		R116	-
	O:7		R2091-2	-
	O:11		R2031	-
<i>Yersinia wautersii</i>	O:4a		#51	-
	O:4a		Y428	-
	O:11		WP-930601	-
	O:11		WP-931205	-
	O:15		12-219N1	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/O:9	5 x 10 ⁷	IP00383	-
	4/O:3		IP00134	-
	1A/NAG		IP33592	-
	1B/O:8		CIP80.27	-
	2/O:5,27		CIP106676	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	5 x 10 ⁷	NA	-
	DH5 alpha		NA	-
<i>Shigella sonnei</i>	Lysotype 4		CIP67,63	-
<i>Salmonella enterica</i>	Sérotype Typhimurium		CIP104474	-
<i>Brucella abortus</i>	Biotype 4		NCTC10503	-
<i>Brucella melitensis</i>	Biotype 2		NCTC10508	-
	Biotype 3		NCTC10509	-

Tableau 34 : Spécificité du test immuno-chromatographique pour la détection de *Y. pseudotuberculosis* I, II, III, IV et V (bandelette Ypseudo). Les bactéries du genre *Yersinia* sont cultivées à 28°C et les autres bactéries à 37°C. Cases (+) : signal visuel perceptible ; cases (-) : pas de signal visuel.

Une bandelette « multiplex » est réalisée avec les AcMs précédemment sélectionnés pour permettre la détection simultanée des *Yersinia* entéropathogènes (figure 59). La spécificité et la sensibilité obtenues avec la bandelette « multiplex » sont similaires à celles obtenues avec les tests individuels bandelettes.

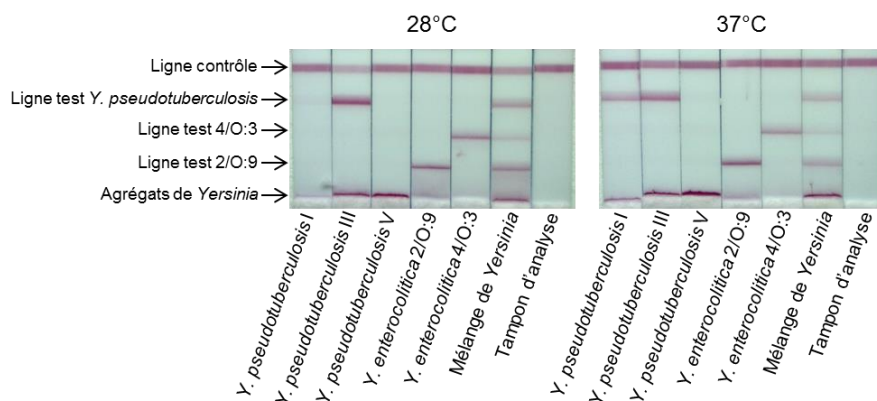


Figure 58 : Test immuno-chromatographique multiplex. Bactéries cultivées à 28°C et utilisées à 10 fois la limite de détection dans du tampon EIA. Les solutions bactériennes sont incubées 10 min avec un mélange des anticorps traceurs Ye18*, Ye300*, Yps104* et Yp7*. Les anticorps Ye4 et Ye 300 sont respectivement utilisés pour les lignes tests 2/O:9 et 4/O:3. Un mélange d'anticorps Yps103 et Yp7 est utilisé pour la ligne test *Y. pseudotuberculosis*. Lecture à 30 min.

3. Les tests des bandelettes avec un échantillon de fèces contaminé artificiellement

Comme pour l'EIA, les bandelettes sont testées avec un échantillon de fèces artificiellement contaminé. Les spécificités et les sensibilités des différents tests bandelettes ne sont pas modifiées avec les fèces comparées à celles obtenues dans le tampon d'analyse simple. Les LoDs des bandelettes 2/O:9 et 4/O:3 sont de 5×10^5 cfu/mL pour la détection respective de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et de *Y. enterocolitica* 4/O:3. La LoD de la bandelette Ypseudo est de 10^5 cfu/mL pour le sérotype I, 5×10^5 cfu/mL pour le sérotype III et 10^6 cfu/mL le sérotype V. Les sérotypes II et IV n'ont pas été testés dans cette matrice.

Il faut noter que la lecture des bandelettes après migration du tampon contenant les fèces est moins aisée car la migration des échantillons laisse des dépôts sur la membrane (figure 59). Cependant, une optimisation concernant le tampon dans lequel sont diluées les fèces peut être envisagée afin de faciliter la migration de l'échantillon et sa lecture.

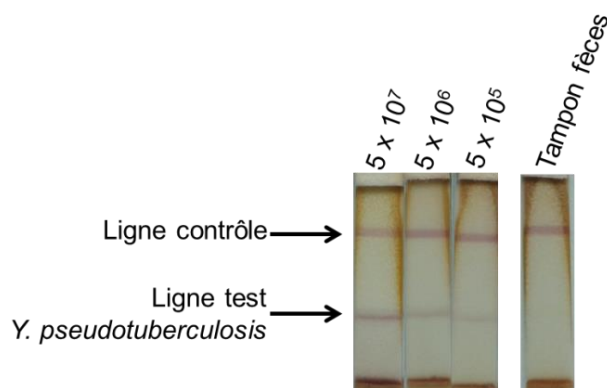


Figure 59 : Exemple de test immuno-chromatographique (bandelettes Ypseudo) utilisant la matrice fèces. Bactérie *Y. pseudotuberculosis* III cultivée à 28°C et diluée en série dans du tampon fèces. Concentration des bactéries en cfu/mL. Lecture visuelle à 30 min.

IV. Discussion et perspectives

Nous avons tout d'abord produit un large panel d'AcMs contre *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* que nous avons sélectionnés pour leur spécificité et leur sensibilité. Cette sélection a été réalisée afin de permettre une détection spécifique de quatre souches prévalentes de *Yersinia* : *Y. enterocolitica* des biosérotypes 2/O:9 et 4/O:3, et *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I et III. Ces AcMs nous ont permis de développer un test EIA en une étape possédant une excellente spécificité et sensibilité, ainsi que des tests bandelettes à faible coût et très faciles d'utilisation avec une bonne spécificité et une relativement bonne sensibilité.

Comparés au protocole de caractérisation impliquant l'isolement de la bactérie sur le milieu CIN, ces deux tests immunométriques offrent une grande amélioration dans la durée de la détection des *Yersinia*. En effet, les bandelettes et l'EIA permettent une caractérisation des *Yersinia* entéropathogènes en respectivement 40 min et 3 h 30, alors que le milieu CIN ne permet que d'isoler des colonies bactériennes en 48 h sans aucune caractérisation. De plus, les bandelettes et l'EIA ne nécessitent pas de protocoles complexes de préparation des échantillons et sont par conséquent, parfaitement adaptés pour une utilisation « terrain » en laboratoires d'analyses médicales ou à l'hôpital.

Il a été décrit que le milieu CIN permettait la croissance de certaines espèces bactériennes présentes dans les fèces telles que *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pseudomonas* et *Serratia* (70, 315). Généralement, la morphologie des colonies peut permettre de distinguer *Y. enterocolitica* des autres bactéries, mais cette distinction peut ne pas être aisée pour un personnel non formé. De plus, les colonies de *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* et *Serratia liquefaciens* ne sont pas différentes et peuvent être la source d'une mauvaise identification. Bien que la spécificité de nos tests n'ait pas été réalisée vis à vis de ces bactéries, d'autres entérobactéries fréquemment recherchées dans les fèces de malades telles que *S. sonnei* et *S. enterica* sérovar Typhimurium ont été testées et aucune n'a été détectée, de même pour *E. coli*. On peut voir

comme une limite le fait que seulement une ou deux souches non spécifiques de chaque espèce ait été évaluée, ce qui ne permet pas une généralisation quant à la spécificité de nos tests. Néanmoins, les anticorps impliqués dans les tests étant pour la plupart dirigés contre les LPS (à l'exception de Yps2), on peut émettre l'hypothèse que la spécificité testée sur un plus grand nombre de souches non caractéristiques ne devrait pas être modifiée. De plus, nos tests immunométriques présentent l'avantage d'être assez robustes pour conserver leurs sensibilités dans des matrices complexes comme les fèces.

Nous avons développé un EIA très sensible dont la LoD est comprise entre 1.2×10^3 et 2.0×10^5 cfu/mL pour la détection de *Y. enterocolitica* biosérotypes 2/O:9 et 4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* sérotypes I et III. La température de croissance des *Yersinia* semble influencer la sensibilité du test EIA. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que des AcMs utilisés dans l'EIA reconnaissent le LPS, qui est plus fortement produit par les *Yersinia* entéropathogènes à 28°C *in vitro* (314), ou ciblent une protéine qui semble être plus exprimée à 37°C. Cependant, ce paramètre de température ne semble influencer que la détection par le format EIA, puisque cette différence n'est pas retrouvée avec le format bandelette. Lorsque l'EIA est effectué avec des fèces, les LoDs ne sont pas ou peu modifiées, à l'exception de l'EIA pour la détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et de *Y. pseudotuberculosis* I qui sont 20 à 35 fois moins sensibles quand les bactéries sont cultivées à 37°C. Ces résultats ne préjugent néanmoins pas de ce que l'on obtiendrait avec des échantillons réels, et des bactéries s'étant développées *in vivo*. De plus, le test EIA n'a pas été validé avec un grand nombre de souches et on ne peut donc pas affirmer que les sensibilités identifiées soient les mêmes pour toutes les souches. Néanmoins, les AcMs utilisés en capture ou en traceur dans le test EIA de détection de *Y. enterocolitica* 2/O:9 et *Y. enterocolitica* 4/O:3 sont les mêmes que ceux utilisés en bandelettes pour la détection des mêmes pathogènes. On peut donc penser que les spécificités seront comparables entre les deux tests immunométriques.

La validation de nos tests bandelettes avec un grand nombre de souches bactériennes a permis la détection de 100% des *Y. enterocolitica* (biosérotypes 2/O:9 et 4/O:3) et des *Y. pseudotuberculosis* (sérotypes II, III, IV et V). Pour le sérotype I, 62,5% des souches ont pu être détectées à 10^7 cfu/mL. Il a été montré que le milieu CIN exerce un effet inhibiteur sur la croissance de souches de *Y. pseudotuberculosis* (50) et par conséquent, nos tests immunologiques peuvent permettre une meilleure détection de cette espèce au sein d'échantillons biologiques.

Les colonies de différentes *Yersinia* présentant un aspect similaire lors de l'isolement sur le milieu CIN (50), la distinction entre les souches pathogènes et non pathogènes est impossible. Pour cette raison, un grand nombre de souches *Yersinia* non pathogènes du biotype 1A ont été testées. Ce sont des souches ubiquitaires dans l'environnement et détectées de façon prédominante dans les échantillons cliniques humains de certains pays européens (26, 27). Seulement une souche de ce type a été détectée avec la bandelette 4/O:3. Cette souche de sérotype O:3 possède le même LPS que *Y. enterocolitica* 4/O:3, ce qui explique cette réaction croisée et confirme que l'AcM Ye300 est bien

dirigé contre le LPS. Cependant, le biosérotype 1A/O:3 est assez exceptionnellement isolé à partir d'échantillons cliniques humains (28) et seulement 4 souches de ce biosérotype inhabituel sont présentes dans la collection de 2722 souches du CNR de la peste et autres yersiniose.

Bien que le sérotype O:9 de *Y. enterocolitica* possède des antigènes commun avec l'antigène O des *Brucella* (84), aucune des trois bactéries de ce genre n'est détectée dans le test bandelette 2/O:9, ni dans les tests bandelettes 4/O:3 et Ypseudo. Cette dernière ne reconnaît pas non plus des souches de *Y. similis* et *Y. wautersii*, deux espèces récemment décrites et proches de *Y. pseudotuberculosis*.

La LoD des tests bandelettes se situe entre 10^5 et 10^6 cfu/mL pour la détection de quatre souches prévalentes de *Yersinia* : *Y. enterocolitica* des biosérotypes 2/O:9 et 4/O:3, et *Y. pseudotuberculosis* des sérotypes I et III. Testées sur un plus grand nombre de souches, les LoDs sont plutôt supérieures (10^6 à 10^7 cfu/ml). Nos tests bandelettes sont également capables de détecter les sérotypes minoritaires II, IV et V de *Y. pseudotuberculosis*. Grâce à la grande robustesse de ces tests bandelettes, les LoDs ne sont pas ou peu modifiées avec un échantillon de fèces artificiellement contaminé.

Il a été montré que la charge bactérienne de *Y. enterocolitica* dans les fèces de patients infectés était comprise entre 10^5 et 10^8 cfu/g de fèces (78). En utilisant la procédure en vigueur dans les laboratoires d'analyses médicales (approximativement 1 g de fèces dilué dans 10 mL de tampon), nos EIAs peuvent clairement être utiles car ils présentent des LoDs inférieures à cette gamme. Les LoDs de nos tests bandelettes sont légèrement au-dessus de la limite basse de 10^5 cfu/g de fèces mais peuvent fonctionner sans problème sur une large partie de cette gamme de concentration attendue dans les échantillons biologiques. Parce que nous avons utilisé un échantillon de fèces issus d'un individu sain, il a été nécessaire de bien les diluer afin d'obtenir un échantillon liquide. Il serait intéressant de déterminer si les échantillons de fèces issus d'individus malades nécessitent une moindre dilution, ce qui pourrait abaisser la LoD. Comparés à d'autres méthodes comme l'isolement sur milieu CIN ou la RT-PCR qui possèdent une $LoD \geq 10^3$ cfu/g de fèces, nos tests immunométriques proposent une détection très rapide et économique qui peut être réalisée par un personnel peu formé et sans besoin d'appareillages supplémentaires pour les bandelettes. Ce temps épargné sur la détection peut permettre de rectifier rapidement un traitement avec des antibiotiques inadaptés et d'éviter facilement les appendicectomies non nécessaires.

De plus, nos tests bandelettes peuvent facilement être utilisés sur le terrain en dehors du laboratoire d'analyses médicales et par conséquent, pourraient être utilisés pour des applications vétérinaires. Premièrement, le sérotype O:9 de *Y. enterocolitica* est souvent isolé de façon naturelle chez les bovins, ovins, caprins et porcs. Mais leurs anticorps contre ce sérotype peuvent engendrer des réactions croisées avec l'antigène O des *Brucella* et causer des réactions faussement positives lors des tests sérologiques de dépistage de la brucellose (316, 317). Ceci représente un problème économique majeur au sein des élevages car selon les réglementations en vigueur, les suspicions de brucellose mènent à l'abattage de l'animal. Nos tests bandelettes pourraient être utilisés afin de distinguer les

infections à *Y. enterocolitica* des infections à *Brucella*. Deuxièmement, le biosérotype 4/O:3 de *Y. enterocolitica* est fréquemment isolé chez le porc dans les élevages ou à l'abattoir alors que la consommation de viande de porc est souvent associée avec les infections à *Y. enterocolitica* (33, 41). Nos tests bandelettes pourraient être utilisés dans l'industrie agro-alimentaire à différents niveaux de la chaîne : dans les élevages afin de contrôler l'absence de *Y. enterocolitica* et pour éviter des contaminations à partir de troupeaux infectés, et dans les abattoirs afin d'exclure les carcasses contaminées (318). Enfin, nos tests bandelettes, utilisables à large échelle et à moindre coût, pourraient être un bon outil pour mener des études épidémiologiques qui permettraient d'obtenir des chiffres plus précis sur la prévalence des *Yersinia* entéropathogènes. Troisièmement, la bactérie *Y. pseudotuberculosis* est un problème vétérinaire récurrent au sein des cheptels et des animaux de zoo qui engendre des coûts économiques importants (35). Nos tests bandelettes pourraient être utilisés sur le terrain en tant que test de présence du pathogène.

En conclusion, cette étude est la première description d'un test immuno-enzymatique très sensible et d'un test immuno-chromatographique très rapide permettant la détection de *Yersinia* entéropathogènes directement dans les fèces. Ils peuvent être utiles au médecin afin de réaliser le diagnostic et seraient bienvenus comme tests rapides de première ligne dans les laboratoires d'analyses médicales ou à l'hôpital. Ils peuvent être un bon outil complémentaire afin d'aider le personnel des laboratoires à concentrer la recherche de *Yersinia* entéropathogènes sur les échantillons de fèces positifs avant de confirmer la détection par l'isolement et l'utilisation de méthodes bactériologiques traditionnelles. C'est pourquoi il nous paraît nécessaire maintenant d'évaluer la sensibilité et la robustesse de ces tests immunométriques dans les conditions réelles d'un laboratoire d'analyses médicales sur des échantillons de patients infectés.

CONCLUSION GÉNÉRALE

Les anticorps, molécules biologiques produites naturellement en réponse à une agression de l'organisme, sont un outil remarquable en médecine pour diagnostiquer et traiter des maladies d'origines diverses. L'immunothérapie se révèle être une thérapie de choix dans le domaine du bioterrorisme où de nombreux agents biologiques peuvent potentiellement être utilisés à des fins malveillantes et souvent sans qu'aucun traitement ne puisse être apporté. Des projets de recherche ont été mis en place pour répondre à cette problématique, et plus particulièrement au CEA à travers le programme NRBC-E. Le laboratoire dans lequel je viens d'effectuer mes trois années de thèse avait déjà produit des anticorps contre différents agents du risque biologique (ricine, toxines botuliques, bactéries...).

Dans le cadre de ma thèse, nous nous sommes intéressés dans un premier temps à produire de nouveaux anticorps monoclonaux murins contre un facteur de virulence clé du bacille de la peste : l'injectisome. Après avoir caractérisé chaque anticorps produit, il est apparu que tous ceux ciblant les protéines LcrV et YscF reconnaissaient bien celles-ci, qu'elles soient sous forme recombinante ou native. Cependant au cours de cette étude, aucun effet neutralisant des anticorps contre *Y. pestis* n'a pu être observé dans un modèle *in vitro* ou *in vivo* de peste bubonique chez la souris. Des expériences supplémentaires sont en cours afin de confirmer définitivement ces résultats.

Ces anticorps monoclonaux contre les protéines LcrV et YscF sont néanmoins de bons candidats à la réalisation de tests immunométriques de diagnostic de *Y. pestis*. En effet, ceux-ci permettent de réaliser des tests immuno-enzymatiques et immuno-chromatographiques sensibles pour la détection de toutes les souches pathogènes de *Y. pestis*, offrant possiblement une amélioration en comparaison aux tests actuellement commercialisés. De premiers résultats favorables obtenus avec différents fluides et échantillons biologiques nous encouragent à continuer le développement de ces tests immunométriques.

Un autre aspect de mon travail de thèse consistait à développer un test de diagnostic contre les *Yersinia* entéropathogènes. Les panels d'anticorps monoclonaux murins obtenus contre les bactéries *Y. enterocolitica* 2/O:9 et 4/O:3 et *Y. pseudotuberculosis* I et III ont permis de développer des tests immuno-enzymatiques et immuno-chromatographiques rapides, spécifiques, sensibles et faciles d'utilisation. De plus, leur manipulation simple avec des échantillons biologiques humains nous permet d'envisager une utilisation dans les laboratoires d'analyses médicales et à l'hôpital mais aussi pour des applications vétérinaires. A notre connaissance, ces travaux correspondent aux premières descriptions rapportant l'utilisation de tests immunométriques pour une détection rapide et robuste des *Yersinia* entéropathogènes.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. **Bergey DH, Buchanan RE, Gibbons NE.** 1974. Bergey's manual of determinative bacteriology. Williams & Wilkins Co., Baltimore.
2. **Van Loghem JJ.** 1944. The classification of the plague-bacillus. *Antonie van Leeuwenhoek* **10**:15.
3. **Sulakvelidze A.** 2000. *Yersinia* other than *Y. enterocolitica*, *Y. pseudotuberculosis*, and *Y. pestis*: the ignored species. *Microbes Infect* **2**:497-513.
4. **Sprague LD, Neubauer H.** 2005. *Yersinia aleksiciae* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **55**:831-835.
5. **Merhej V, Adekambi T, Pagnier I, Raoult D, Drancourt M.** 2008. *Yersinia massiliensis* sp. nov., isolated from fresh water. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:779-784.
6. **Hurst MR, Becher SA, Young SD, Nelson TL, Glare TR.** 2011. *Yersinia entomophaga* sp. nov., isolated from the New Zealand grass grub *Costelytra zealandica*. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:844-849.
7. **Murros-Konttinen A, Johansson P, Niskanen T, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Björkroth J.** 2011. *Yersinia pekkanenii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:2363-2367.
8. **Murros-Konttinen A, Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H, Johansson P, Rahkila R, Björkroth J.** 2011. *Yersinia nurmii* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **61**:2368-2372.
9. **Savin C, Martin L, Bouchier C, Filali S, Chenau J, Zhou Z, Becher F, Fukushima H, Thomson NR, Scholz HC, Carniel E.** 2014. The *Yersinia pseudotuberculosis* complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. *Int J Med Microbiol*.
10. **Sprague LD, Scholz HC, Amann S, Busse HJ, Neubauer H.** 2008. *Yersinia similis* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* **58**:952-958.
11. **Tobback E, Decostere A, Hermans K, Haesebrouck F, Chiers K.** 2007. *Yersinia ruckeri* infections in salmonid fish. *J Fish Dis* **30**:257-268.
12. **Prentice MB, Rahalison L.** 2007. Plague. *Lancet* **369**:1196-1207.
13. **Malassez L-C, Vignal W.** 1883. Physiologie pathologique: Tuberculose zoogloïque. *Acad Sci Comptes Rend Hebdomad Séances l'Acad Sci* **97**:1006-1009.
14. **Malassez L-C, Vignal W.** 1884. Sur le micro-organisme de la tuberculose zoogloïque *Arch Physiol Norm Pathol* **4**:81-104.
15. **Mollaret HH.** 1965. Sur la nomenclature et la taxinomie du bacille de Malassez et Vignal. *Bull Bact Nomencl Taxon* **15**:97-106.
16. **Mollaret HH.** 1995. Fifteen centuries of Yersiniosis. *Contrib Microbiol Immunol* **13**:1-4.
17. **Bottone EJ.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin Microbiol Rev* **10**:257-276.
18. **Schleifstein JI, Coleman MB.** 1943. *Bacterium enterocoliticum*, p 56, Annual Report of the Division of Laboratories and Research New York State Department of Health, Albany, NY.
19. **Schleifstein JI, Coleman MB.** 1939. An unidentified microorganism resembling *B. lignieri* and *Pasteurella pseudotuberculosis* and pathogenic for man. *NY State J Med* **39**:1749-1753.
20. **Frederiksen W.** A study of some *Yersinia pseudotuberculosis*-like bacteria ("Bacterium enterocoliticum" and "pasteurella X"), p. *In Press*. NU (ed),
21. **Bottone EJ.** 1999. *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microbes Infect* **1**:323-333.
22. **Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK.** 2011. Pathogenesis of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog* **2011**:182051.
23. **Carniel E, Autenrieth I, Cornelis G, Fukushima H, Guinet F, Isberg R, Pham J, Prentice M, Somonet M, Skurnik M, Wauters G.** 2006. Prokaryotes, p 230-398, Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass, vol 6. Springer.
24. **Guinet F, Carniel E, Leclercq A.** 2011. Transfusion-transmitted *Yersinia enterocolitica* sepsis. *Clin Infect Dis* **53**:583-591.
25. **McNally A, Cheasty T, Fearnley C, Dalziel RW, Paiba GA, Manning G, Newell DG.** 2004. Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett Appl Microbiol* **39**:103-108.
26. **Sihvonen LM, Haukka K, Kuusi M, Virtanen MJ, Siitonen A, group Ys.** 2009. *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like species in clinical stool specimens of humans: identification and prevalence of bio/serotypes in Finland. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **28**:757-765.
27. **Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R.** 2012. *Yersinia enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **31**:1543-1550.
28. **Sihvonen LM, Jalkanen K, Huovinen E, Toivonen S, Corander J, Kuusi M, Skurnik M, Siitonen A, Haukka K.** 2012. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related properties. *BMC Microbiol* **12**:208.

29. **Batzilla J, Heesemann J, Rakin A.** 2011. The pathogenic potential of *Yersinia enterocolitica* 1A. *Int J Med Microbiol* **301**:556-561.
30. **Moriki S, Nobata A, Shibata H, Nagai A, Minami N, Taketani T, Fukushima H.** 2010. Familial outbreak of *Yersinia enterocolitica* serotype O9 biotype 2. *J Infect Chemother* **16**:56-58.
31. **Grahek-Ogden D, Schimmer B, Cudjoe KS, Nygård K, Kapperud G.** 2007. Outbreak of *Yersinia enterocolitica* serogroup O:9 infection and processed pork, Norway. *Emerg Infect Dis* **13**:754-756.
32. **MacDonald E, Heier BT, Nygård K, Stalheim T, Cudjoe KS, Skjerdal T, Wester AL, Lindstedt BA, Stavnes TL, Vold L.** 2012. *Yersinia enterocolitica* outbreak associated with ready-to-eat salad mix, Norway, 2011. *Emerg Infect Dis* **18**:1496-1499.
33. **Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H.** 2006. Sporadic human *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from pigs. *Journal of Medical Microbiology* **55**:747-749.
34. **Ackers ML, Schoenfeld S, Markman J, Smith MG, Nicholson MA, DeWitt W, Cameron DN, Griffin PM, Slutsker L.** 2000. An outbreak of *Yersinia enterocolitica* O:8 infections associated with pasteurized milk. *J Infect Dis* **181**:1834-1837.
35. **Quintard B, Petit T, Ruvoen N, Carniel E, Demeure CE.** 2010. Efficacy of an oral live vaccine for veterinary use against pseudotuberculosis. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **33**:e59-65.
36. **Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, Rasko DA, Kokorina G, Fayolle C, Lindler LE, Carniel E, Ravel J.** 2007. The complete genome sequence of *Yersinia pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. *PLoS Genet* **3**:e142.
37. **Vincent P, Leclercq A, Martin L, Duez JM, Simonet M, Carniel E, Yersinia Surveillance N.** 2008. Sudden onset of pseudotuberculosis in humans, France, 2004-05. *Emerging Infectious Diseases* **14**:1119-1122.
38. **Denis M, Minvielle B, Feurer C, Desmonts M-H, Carniel E.** 2012. Épidémiologie de *Yersinia enterocolitica* chez le porc, réservoir animal de souches pathogènes pour l'Homme. *Bulletin Épidémiologique Hebdomadaire*:50-51.
39. **Andersen JK.** 1988. Contamination of freshly slaughtered pig carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int J Food Microbiol* **7**:193-202.
40. **Fondrevéz M, Minvielle B, Labbe A, Houdayer C, Rose N, Esnault E, Denis M.** 2014. Prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughter-aged pigs during a one-year survey, 2010-2011, France. *International Journal of Food Microbiology* **174**:56-62.
41. **Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ.** 2003. Occurrence of *Y-enterocolitica* in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering and dressing procedures. *Genus Yersinia: Entering the Functional Genomic Era* **529**:303-308.
42. **Hayashidani H, Iwata T, Yamaguchi S, Hara-Kudo Y, Okatani TA, Watanabe M, Lee KI, Kumagai S.** 2008. Survival of Pathogenic *Yersinia enterocolitica* in Vacuum-packed or Non-vacuum-packed Pork at Low Temperature. *Biocontrol Science* **13**:139-144.
43. **Nesbakken T, Kapperud G, Lassen J, Skjerve E.** 1991. *Yersinia enterocolitica* O:3 antibodies in slaughterhouse employees, veterinarians, and military recruits. Occupational exposure to pigs as a risk factor for yersiniosis. *Contrib Microbiol Immunol* **12**:32-39.
44. **Jerrett IV, Slee KJ.** 1989. Bovine abortion associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Vet Pathol* **26**:181-183.
45. **Sanford SE.** 1995. Outbreaks of yersiniosis caused by *Yersinia pseudotuberculosis* in farmed cervids. *J Vet Diagn Invest* **7**:78-81.
46. **Ljungberg P, Valtonen M, Harjola VP, Kaukoranta-Tolvanen SS, Vaara M.** 1995. Report of four cases of *Yersinia pseudotuberculosis* septicemia and a literature review. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14**:804-810.
47. **Carniel E.** 2011. Centre National de Référence de la peste et autres yersinioses : Bilan des activités 2006-2010. Institut Pasteur,
48. **Anonymous.** 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. European Food Safety Authority European Centre for Disease Prevention and Control,
49. **Anonymous.** 2013. Annual Epidemiological Report 2013. European Centre for Disease Prevention and Control, Control ECfDPa, Stockholm.
50. **Savin C, Leclercq A, Carniel E.** 2012. Evaluation of a single procedure allowing the isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from human stools. *PLoS One* **7**:e41176.
51. **Savin C, Leclercq A, Laurent E, Carniel E, Vaillant V.** 2010. Enquête nationale sur le diagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes en France métropolitaine en 2003. *Bull Epid Hebd* **29**:307-311.

52. **De Koning-Ward TF, Robins-Browne RM.** 1995. Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun* **63**:3790-3795.
53. **Riot B, Berche P, Simonet M.** 1997. Urease is not involved in the virulence of *Yersinia pseudotuberculosis* in mice. *Infect Immun* **65**:1985-1990.
54. **Clark MA, Hirst BH, Jepson MA.** 1998. M-cell surface beta 1 integrin expression and invasion-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch M cells. *Infection and Immunity* **66**:1237-1243.
55. **Meccas J, Bilis I, Falkow S.** 2001. Identification of attenuated *Yersinia pseudotuberculosis* strains and characterization of an orogastric infection in BALB/c mice on day 5 postinfection by signature-tagged mutagenesis. *Infection and Immunity* **69**:2779-2787.
56. **Barnes PD, Bergman MA, Meccas J, Isberg RR.** 2006. *Yersinia pseudotuberculosis* disseminates directly from a replicating bacterial pool in the intestine. *Journal of Experimental Medicine* **203**:1591-1601.
57. **Tsukano H, Kura F, Inoue S, Sato S, Izumiya H, Yasuda T, Watanabe H.** 1999. *Yersinia pseudotuberculosis* blocks the phagosomal acidification of B10.A mouse macrophages through the inhibition of vacuolar H(+)-ATPase activity. *Microb Pathog* **27**:253-263.
58. **Rüssmann H, Ruckdeschel K, Heesemann J.** 1996. Translocation of *Yersinia enterocolitica* through an endothelial monolayer by polymorphonuclear leukocytes. *Infect Immun* **64**:1016-1019.
59. **Rosner BM, Werber D, Hohle M, Stark K.** 2013. Clinical aspects and self-reported symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based study, Germany 2009-2010. *BMC Infect Dis* **13**:236.
60. **Marks MI, Pai CH, Lafleur L, Lackman L, Hammerberg O.** 1980. *Yersinia enterocolitica* gastroenteritis: a prospective study of clinical, bacteriologic, and epidemiologic features. *J Pediatr* **96**:26-31.
61. **Brouqui P, Raoult D.** 2001. Endocarditis due to rare and fastidious bacteria. *Clinical Microbiology Reviews* **14**:177-+.
62. **Tame S, de Wit D, Meek A.** 1998. *Yersinia enterocolitica* and mycotic aneurysm. *Australian and New Zealand Journal of Surgery* **68**:813-814.
63. **Hadou T, Elfarra M, Alauzet C, Guinet F, Lozniewski A, Lion C.** 2006. Abdominal aortic aneurysm infected by *Yersinia pseudotuberculosis*. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:3457-3458.
64. **Perdikogianni C, Galanakis E, Michalakis M, Giannoussi E, Maraki S, Tselentis Y, Charissis G.** 2006. *Yersinia enterocolitica* infection mimicking surgical conditions. *Pediatric Surgery International* **22**:589-592.
65. **Yotsu R, Mii S, Hayashi R, Harada H, Furukawa K, Eto H.** 2010. Erythema nodosum associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *J Dermatol* **37**:819-822.
66. **Kaasch AJ, Dinter J, Goeser T, Plum G, Seifert H.** 2012. *Yersinia pseudotuberculosis* bloodstream infection and septic arthritis: case report and review of the literature. *Infection* **40**:185-190.
67. **Sieper J, Kingsley GH, MarkerHermann E.** 1996. Aetiological agents and immune mechanisms in enterogenic reactive arthritis. *Baillieres Clinical Rheumatology* **10**:105-121.
68. **Mollaret HH, Carniel E, Guilvout I.** 1990. La Fievre Scarlatiniforme d'Extreme-Orient. *Médecine et Maladies Infectieuses* **20**:519-529.
69. **Vincent P, Salo E, Skurnik M, Fukushima H, Simonet M.** 2007. Similarities of Kawasaki disease and *Yersinia pseudotuberculosis* infection epidemiology. *Pediatric Infectious Disease Journal* **26**:629-631.
70. **Head CB, Whitty DA, Ratnam S.** 1982. Comparative study of selective media for recovery of *Yersinia enterocolitica*. *J Clin Microbiol* **16**:615-621.
71. **Hallanvuo S, Peltola J, Heiskanen T, Siitonen A.** 2006. Simplified phenotypic scheme evaluated by 16S rRNA sequencing for differentiation between *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia enterocolitica*-like species. *Journal of Clinical Microbiology* **44**:1077-1080.
72. **Wauters G, Kandolo K, Janssens M.** 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib Microbiol Immunol* **9**:14-21.
73. **Savin C, Carniel E.** 2008. Les diarrhées d'origine bactérienne : le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires* **2008**:49-58.
74. **Durisin MD, Ibrahim A, Griffiths MW.** 1997. Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in milk and pork using a DIG-labelled probe targeted against the *yst* gene. *Int J Food Microbiol* **37**:103-112.
75. **Nesbakken T, Kapperud G, Dommarsnes K, Skurnik M, Hornes E.** 1991. Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products. *Appl Environ Microbiol* **57**:389-394.
76. **Marranzano M, Coniglio MA, Mauro L.** 2003. Evaluation of pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) for *Yersinia enterocolitica* molecular epidemiology investigations. *Adv Exp Med Biol* **529**:375-378.

77. **Foley SL, Lynne AM, Nayak R.** 2009. Molecular typing methodologies for microbial source tracking and epidemiological investigations of Gram-negative bacterial foodborne pathogens. *Infect Genet Evol* **9**:430-440.
78. **Zheng H, Sun Y, Lin S, Mao Z, Jiang B.** 2008. *Yersinia enterocolitica* infection in diarrheal patients. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* **27**:741-752.
79. **Antikainen J, Kantele A, Pakkanen SH, Lääveri T, Riutta J, Vaara M, Kirveskari J.** 2013. A quantitative polymerase chain reaction assay for rapid detection of 9 pathogens directly from stools of travelers with diarrhea. *Clin Gastroenterol Hepatol* **11**:1300-1307.e1303.
80. **Cremonesi P, Pisani LF, Lecchi C, Ceciliani F, Martino P, Bonastre AS, Karus A, Balzaretto C, Castiglioni B.** 2014. Development of 23 individual TaqMan(®) real-time PCR assays for identifying common foodborne pathogens using a single set of amplification conditions. *Food Microbiol* **43**:35-40.
81. **Garzetti D, Susen R, Fruth A, Tietze E, Heesemann J, Rakin A.** 2014. A molecular scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide analysis. *Int J Med Microbiol* **304**:275-283.
82. **Estrada CS, Velázquez LeC, Favier GI, Genaro MS, Escudero ME.** 2012. Detection of *Yersinia* spp. in meat products by enrichment culture, immunomagnetic separation and nested PCR. *Food Microbiol* **30**:157-163.
83. **Tuuminen T, Lounamo K, Leirisalo-Repo M.** 2013. A review of serological tests to assist diagnosis of reactive arthritis: critical appraisal on methodologies. *Front Immunol* **4**:418.
84. **Chart H, Cheasty T.** 2006. The serodiagnosis of human infections with *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **47**:391-397.
85. **Ståhlberg TH, Heesemann J, Granfors K, Toivanen A.** 1989. Immunoblot analysis of IgM, IgG, and IgA responses to plasmid encoded released proteins of *Yersinia enterocolitica* in patients with or without yersinia triggered reactive arthritis. *Ann Rheum Dis* **48**:577-581.
86. **Granfors K.** 1979. Measurement of immunoglobulin M (IgM), IgG, and IgA antibodies against *Yersinia enterocolitica* by enzyme-linked immunosorbent assay: persistence of serum antibodies during disease. *J Clin Microbiol* **9**:336-341.
87. **Rizzardì K, Wahab T, Jernberg C.** 2013. Rapid subtyping of *Yersinia enterocolitica* by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) for diagnostics and surveillance. *J Clin Microbiol* **51**:4200-4203.
88. **Stephan R, Cernela N, Ziegler D, Pflüger V, Tonolla M, Ravasi D, Fredriksson-Ahomaa M, Hächler H.** 2011. Rapid species specific identification and subtyping of *Yersinia enterocolitica* by MALDI-TOF mass spectrometry. *J Microbiol Methods* **87**:150-153.
89. **Guarino A, Ashkenazi S, Gendrel D, Vecchio AL, Shamir R, Szajewska H.** 2014. European Society for Paediatric Gastroenterology, Hepatology, and Nutrition/European Society for Paediatric Infectious Diseases Evidence-based Guidelines for the Management of Acute Gastroenteritis in Children in Europe: Update 2014. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.*
90. **Manatsathit S, Dupont HL, Farthing M, Kositchaiwat C, Leelakusolvong S, Ramakrishna BS, Sabra A, Speelman P, Surangsrirat S.** 2002. Guideline for the management of acute diarrhea in adults. *J Gastroenterol Hepatol* **17 Suppl**:S54-71.
91. **Pham JN, Bell SM, Martin L, Carniel E.** 2000. The beta-lactamases and beta-lactam antibiotic susceptibility of *Yersinia enterocolitica*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**:951-957.
92. **Bonke R, Wacheck S, Stuber E, Meyer C, Martlbauer E, Fredriksson-Ahomaa M.** 2011. Antimicrobial Susceptibility and Distribution of beta-Lactamase A (blaA) and beta-Lactamase B (blaB) Genes in Enteropathogenic *Yersinia* Species. *Microbial Drug Resistance* **17**:575-581.
93. **Sykes RB, Matthew M.** 1976. The beta-lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to beta-lactam antibiotics. *The Journal of antimicrobial chemotherapy* **2**:115-157.
94. **Pham JN, Bell SM, Hardy MJ, Martin L, Guiyoule A, Carniel E.** 1995. Susceptibility to beta-lactam agents of *Yersinia enterocolitica* biotype 4, serotype O3 isolated in various parts of the world. *J Med Microbiol* **43**:9-13.
95. **delaPrieta M, Seoane A, Diaz J, Navas J, GarciaLobo JM.** 1995. Beta-lactamase genes and beta-lactamic susceptibility in *Yersinia enterocolitica*. *Yersiniosis: Present and Future* **13**:184-187.
96. **Terentjeva M, Berzins A.** 2010. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* in Slaughter Pigs in Latvia. *Journal of Food Protection* **73**:1335-1338.
97. **Reece RL, Coloe PJ.** 1985. The resistance to anti-microbial agents of bacteria isolated from pathological conditions of birds in Victoria, 1978 to 1983. *Aust Vet J* **62**:379-381.
98. **Scharff RL.** 2012. Economic burden from health losses due to foodborne illness in the United States. *J Food Prot* **75**:123-131.
99. **Callinan RB, Cook RW, Boulton JG, Fraser GC, Unger DB.** 1988. Enterocolitis in cattle associated with *Yersinia pseudotuberculosis* infection. *Aust Vet J* **65**:8-11.

100. **Slee KJ, Skilbeck NW.** 1992. Epidemiology of *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica* infections in sheep in Australia. *J Clin Microbiol* **30**:712-715.
101. **Welsh RD, Ely RW, Holland RJ.** 1992. Epizootic of *Yersinia pseudotuberculosis* in a wildlife park. *J Am Vet Med Assoc* **201**:142-144.
102. **Zietz BP, Dunkelberg H.** 2004. The history of the plague and the research on the causative agent *Yersinia pestis*. *Int J Hyg Environ Health* **207**:165-178.
103. **Littman RJ, Littman ML.** 1973. Galen and the Antonine plague. *Am J Philol* **94**:243-255.
104. **Littman RJ.** 2009. The plague of Athens: epidemiology and paleopathology. *Mt Sinai J Med* **76**:456-467.
105. **Perry RD, Fetherston JD.** 1997. *Yersinia pestis*--etiologic agent of plague. *Clin Microbiol Rev* **10**:35-66.
106. **Little LK.** 2007. *Plague and the end of antiquity : the pandemic of 541-750*. Cambridge University Press, New York.
107. **Drancourt M, Roux V, Dang LV, Tran-Hung L, Castex D, Chenal-Francisque V, Ogata H, Fournier PE, Crubezy E, Raoult D.** 2004. Genotyping, *Orientalis*-like *Yersinia pestis*, and plague pandemics. *Emerg Infect Dis* **10**:1585-1592.
108. **Wiechmann I, Grupe G.** 2005. Detection of *Yersinia pestis* DNA in two early medieval skeletal finds from Aschheim (Upper Bavaria, 6th century A.D.). *Am J Phys Anthropol* **126**:48-55.
109. **Harbeck M, Seifert L, Hansch S, Wagner DM, Birdsell D, Parise KL, Wiechmann I, Grupe G, Thomas A, Keim P, Zoller L, Bramanti B, Riehm JM, Scholz HC.** 2013. *Yersinia pestis* DNA from skeletal remains from the 6(th) century AD reveals insights into Justinianic Plague. *PLoS Pathog* **9**:e1003349.
110. **Devaux CA.** 2013. Small oversights that led to the Great Plague of Marseille (1720-1723): lessons from the past. *Infect Genet Evol* **14**:169-185.
111. **Callaway E.** 2011. Plague genome: The Black Death decoded, p 444-446, *Nature*, vol 478, England.
112. **Drancourt M, Raoult D.** 2011. Genotyping *Yersinia pestis* in historical plague. *Lancet Infect Dis* **11**:894-895.
113. **Pryor EG.** 1975. The great plague of Hong Kong. *J Hong Kong Branch R Asiat Soc* **15**:61-70.
114. **Solomon T.** 1997. Hong Kong, 1894: the role of James A Lowson in the controversial discovery of the plague bacillus. *Lancet* **350**:59-62.
115. **Mollaret H, H., Brossollet J.** 1985. *Alexandre Yersin ou le vainqueur de la peste*. Fayard, Paris.
116. **Yersin A.** 1894. La peste bubonique à Hong-Kong. *Ann Inst Pasteur* **8**:662-667.
117. **Kitasato S.** 1894. The bacillus of bubonic plague. *The Lancet* **144**:428-430.
118. **Yersin A.** 1897. Sur la peste bubonique (sérothérapie). *Ann Inst Pasteur* **11**:81-93.
119. **Mollaret HH.** 1991. La découverte par Paul-Louis Simond du rôle de la puce dans la transmission de la peste. *Rev prat* **41**:1947-1952.
120. **Simond P-L.** 1898. La propagation de la peste. *Ann Inst Pasteur* **12**:625-687.
121. **Gauthier JC, Raybaud A.** 1903. Recherches expérimentales sur le rôle des parasites du rat dans la transmission de la peste. *Rev Hyg* **XXV**:426-438.
122. **Bacot AW, Martin CJ.** 1914. Reports on plague investigations in India. LXVII. Observations on the mechanism of the transmission of plague by fleas. *J Hyg* **13**:423-439.
123. **Bibel DJ, Chen TH.** 1976. Diagnosis of plague: an analysis of the Yersin-Kitasato controversy. *Bacteriol Rev* **40**:633-651.
124. **Anonymous.** 1999. *Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control*. World Health Organization.
125. **Chouikha I, Hinnebusch BJ.** 2012. *Yersinia*--flea interactions and the evolution of the arthropod-borne transmission route of plague. *Curr Opin Microbiol* **15**:239-246.
126. **Hinnebusch BJ, Perry RD, Schwan TG.** 1996. Role of the *Yersinia pestis* hemin storage (hms) locus in the transmission of plague by fleas. *Science* **273**:367-370.
127. **Engelthaler DM, Hinnebusch BJ, Rittner CM, Gage KL.** 2000. Quantitative competitive PCR as a technique for exploring flea-*Yersinia pestis* dynamics. *Am J Trop Med Hyg* **62**:552-560.
128. **Eisen RJ, Bearden SW, Wilder AP, Montenieri JA, Antolin MF, Gage KL.** 2006. Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked fleas as a mechanism explaining rapidly spreading plague epizootics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:15380-15385.
129. **Eisen RJ, Wilder AP, Bearden SW, Montenieri JA, Gage KL.** 2007. Early-phase transmission of *Yersinia pestis* by unblocked *Xenopsylla cheopis* (Siphonaptera: Pulicidae) is as efficient as transmission by blocked fleas. *J Med Entomol* **44**:678-682.
130. **Thomas RE, Karstens RH, Schwan TG.** 1990. Experimental infection of *Ornithodoros* spp. ticks (Acari: Argasidae) with *Yersinia pestis*. *J Med Entomol* **27**:720-723.

131. **Webb CT, Brooks CP, Gage KL, Antolin MF.** 2006. Classic flea-borne transmission does not drive plague epizootics in prairie dogs. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:6236-6241.
132. **Easterday WR, Kausrud KL, Star B, Heier L, Haley BJ, Ageyev V, Colwell RR, Stenseth NC.** 2012. An additional step in the transmission of *Yersinia pestis*? *Isme j* **6**:231-236.
133. **Drancourt M, Houhamdi L, Raoult D.** 2006. *Yersinia pestis* as a telluric, human ectoparasite-borne organism. *Lancet Infect Dis* **6**:234-241.
134. **Ayyadurai S, Houhamdi L, Lepidi H, Nappez C, Raoult D, Drancourt M.** 2008. Long-term persistence of virulent *Yersinia pestis* in soil. *Microbiology* **154**:2865-2871.
135. **Eisen RJ, Petersen JM, Higgins CL, Wong D, Levy CE, Mead PS, Schriefer ME, Griffith KS, Gage KL, Beard CB.** 2008. Persistence of *Yersinia pestis* in soil under natural conditions. *Emerg Infect Dis* **14**:941-943.
136. **Christie AB, Chen TH, Elberg SS.** 1980. Plague in camels and goats: their role in human epidemics. *J Infect Dis* **141**:724-726.
137. **Bin Saeed AA, Al-Hamdan NA, Fontaine RE.** 2005. Plague from eating raw camel liver. *Emerg Infect Dis* **11**:1456-1457.
138. **Gage KL, Dennis DT, Orloski KA, Ettestad P, Brown TL, Reynolds PJ, Pape WJ, Fritz CL, Carter LG, Stein JD.** 2000. Cases of cat-associated human plague in the Western US, 1977-1998. *Clin Infect Dis* **30**:893-900.
139. **Frank KM, Schneewind O, Shieh WJ.** 2011. Investigation of a researcher's death due to septicemic plague. *N Engl J Med* **364**:2563-2564.
140. **Watson RP, Blanchard TW, Mense MG, Gasper PW.** 2001. Histopathology of experimental plague in cats. *Vet Pathol* **38**:165-172.
141. **Wild MA, Shenk TM, Spraker TR.** 2006. Plague as a mortality factor in Canada lynx (*Lynx canadensis*) reintroduced to Colorado. *J Wildl Dis* **42**:646-650.
142. **Lorange EA, Race BL, Sebbane F, Joseph Hinnebusch B.** 2005. Poor vector competence of fleas and the evolution of hypervirulence in *Yersinia pestis*. *J Infect Dis* **191**:1907-1912.
143. **Burroughs AL.** 1947. Sylvatic plague studies: The vector efficiency of nine species of fleas compared with *Xenopsylla cheopis*. *J Hyg (Lond)* **45**:371-396.
144. **Buckland PC, Sadler JP.** 1989. A Biogeography of the Human Flea, *Pulex irritans* L. (Siphonaptera: Pulicidae). *Journal of Biogeography* **16**:115-120.
145. **Laudisoit A, Leirs H, Makundi RH, Van Dongen S, Davis S, Neerinckx S, Deckers J, Libois R.** 2007. Plague and the human flea, Tanzania. *Emerg Infect Dis* **13**:687-693.
146. **Tsiamis C, Poulakou-Rebelakou E, Marketos S.** 2013. Earthquakes and plague during Byzantine times: can lessons from the past improve epidemic preparedness. *Acta Med Hist Adriat* **11**:55-64.
147. **Anonymous.** 2003. Imported plague--New York City, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* **52**:725-728.
148. **Anonymous.** 2008. Règlement sanitaire international (2005) 2ème édition. Organisation mondiale de la santé, Genève.
149. **Anonymous.** 2010. Human plague: review of regional morbidity and mortality, 2004–2009. *World Health Organization Weekly Epidemiological Record* **85**:40-45.
150. **Anonymous.** 2004. Human plague in 2002 and 2003. *World Health Organization Weekly Epidemiological Record* **79**:301-306.
151. **Anonymous.** 2010-12-07 12:32:03 2010. Global Alert and Response Plague, *on* World Health Organization. <http://www.who.int/csr/don/archive/disease/plague/en/>. Accessed
152. **Duplantier JM, Duchemin JB, Chanteau S, Carniel E.** 2005. From the recent lessons of the Malagasy foci towards a global understanding of the factors involved in plague reemergence. *Vet Res* **36**:437-453.
153. **Anonymous.** 2008. Peste situation mondiale 8 janvier 2008. Institut de Veille Sanitaire,
154. **Cabanel N, Leclercq A, Chenal-Francisque V, Annajar B, Rajerison M, Bekkhoucha S, Bertherat E, Carniel E.** 2013. Plague outbreak in Libya, 2009, unrelated to plague in Algeria. *Emerg Infect Dis* **19**:230-236.
155. **Stapp P, Antolin MF, Ball M.** 2004. Patterns of extinction in prairie dog metapopulations: plague outbreaks follow El Nino events. *Frontiers in Ecology and the Environment* **2**:235-240.
156. **Kausrud KL, Viljugrein H, Frigessi A, Begon M, Davis S, Leirs H, Dubyanskiy V, Stenseth NC.** 2007. Climatically driven synchrony of gerbil populations allows large-scale plague outbreaks. *Proc Biol Sci* **274**:1963-1969.
157. **Pujol C, Bliska JB.** 2005. Turning *Yersinia* pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. *Clin Immunol* **114**:216-226.

158. **Lukaszewski RA, Kenny DJ, Taylor R, Rees DG, Hartley MG, Oyston PC.** 2005. Pathogenesis of *Yersinia pestis* infection in BALB/c mice: effects on host macrophages and neutrophils. *Infect Immun* **73**:7142-7150.
159. **Motin VL, Georgescu AM, Fitch JP, Gu PP, Nelson DO, Mabery SL, Garnham JB, Sokhansanj BA, Ott LL, Coleman MA, Elliott JM, Kegelmeyer LM, Wyrobek AJ, Slezak TR, Brubaker RR, Garcia E.** 2004. Temporal global changes in gene expression during temperature transition in *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **186**:6298-6305.
160. **Chauvaux S, Rosso ML, Frangeul L, Lacroix C, Labarre L, Schiavo A, Marceau M, Dillies MA, Foulon J, Coppee JY, Medigue C, Simonet M, Carniel E.** 2007. Transcriptome analysis of *Yersinia pestis* in human plasma: an approach for discovering bacterial genes involved in septicemic plague. *Microbiology* **153**:3112-3124.
161. **Sebbane F, Jarrett CO, Gardner D, Long D, Hinnebusch BJ.** 2006. Role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator in the incidence of distinct septicemic and bubonic forms of flea-borne plague. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:5526-5530.
162. **Arbaji A, Kharabsheh S, Al-Azab S, Al-Kayed M, Amr ZS, Abu Baker M, Chu MC.** 2005. A 12-case outbreak of pharyngeal plague following the consumption of camel meat, in north-eastern Jordan. *Ann Trop Med Parasitol* **99**:789-793.
163. **Schofield DA, Sharp NJ, Westwater C.** 2012. Phage-based platforms for the clinical detection of human bacterial pathogens. *Bacteriophage* **2**:105-283.
164. **Stenseth NC, Atshabar BB, Begon M, Belmain SR, Bertherat E, Carniel E, Gage KL, Leirs H, Rahalison L.** 2008. Plague: past, present, and future. *PLoS Med* **5**:e3.
165. **Leclercq AJ, Torrea G, Chenal-Francisque V, Carniel E.** 2007. 3 IS-RFLP: a powerful tool for geographical clustering of global isolates of *Yersinia pestis*. *Adv Exp Med Biol* **603**:322-326.
166. **Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Mahafaly, Rasolomaharo M, Boisier P, O'Brien T, Aldrich J, Keleher A, Morgan C, Burans J.** 2000. Early diagnosis of bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick. *Int J Med Microbiol* **290**:279-283.
167. **Simon S, Demeure C, Lamourette P, Filali S, Plaisance M, Creminon C, Volland H, Carniel E.** 2013. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field investigation of plague foci. *PLoS One* **8**:e54947.
168. **Ayyadurai S, Flaudrops C, Raoult D, Drancourt M.** 2010. Rapid identification and typing of *Yersinia pestis* and other *Yersinia* species by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry. *BMC Microbiol* **10**:285.
169. **Chanteau S, Rahalison L, Ralafiarisoa L, Foulon J, Ratsitorahina M, Ratsifasoamanana L, Carniel E, Nato F.** 2003. Development and testing of a rapid diagnostic test for bubonic and pneumonic plague. *Lancet* **361**:211-216.
170. **Anonymous.** 2013. Peste : comment signaler et notifier cette maladie ?, on Institut de Veille Sanitaire. <http://www.invs.sante.fr/fr/Dossiers-thematiques/Maladies-infectieuses/Zoonoses/Peste/Comment-signaler-et-notifier-cette-maladie>. Accessed
171. **Boulanger LL, Ettestad P, Fogarty JD, Dennis DT, Romig D, Mertz G.** 2004. Gentamicin and tetracyclines for the treatment of human plague: review of 75 cases in new Mexico, 1985-1999. *Clin Infect Dis* **38**:663-669.
172. **Galimand M, Carniel E, Courvalin P.** 2006. Resistance of *Yersinia pestis* to antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:3233-3236.
173. **Wheelis M.** 2002. Biological warfare at the 1346 siege of Caffa. *Emerg Infect Dis* **8**:971-975.
174. **Christopher GW, Cieslak TJ, Pavlin JA, Eitzen EM, Jr.** 1997. Biological warfare. A historical perspective. *Jama* **278**:412-417.
175. **Viallet S.** 2004. Kizu : les fantômes de l'unité 731.
176. **Inglesby TV, Dennis DT, Henderson DA, Bartlett JG, Ascher MS, Eitzen E, Fine AD, Friedlander AM, Hauer J, Koerner JF, Layton M, McDade J, Osterholm MT, O'Toole T, Parker G, Perl TM, Russell PK, Schoch-Spana M, Tonat K.** 2000. Plague as a biological weapon: medical and public health management. Working Group on Civilian Biodefense. *Jama* **283**:2281-2290.
177. **Tucker JB.** 2013. Toxic Terror.
178. **Darling RG, Catlett CL, Huebner KD, Jarrett DG.** 2002. Threats in bioterrorism. I: CDC category A agents. *Emerg Med Clin North Am* **20**:273-309.
179. **Anonymous.** 2013. CDC | Bioterrorism Agents/Diseases. <http://www.bt.cdc.gov/agent/agentlist-category.asp>. Accessed
180. **Bercovier H, Mollaret HH, Alonso JM, Brault J, Fanning RG, Steigerwalt AG, Brenner DJ.** 1980. Intra- and interspecies relatedness of *Yersinia pestis* by DNA hybridization and its relationship to *Yersinia pseudotuberculosis*. *Current Microbiology* **4**:225-229.

181. **Trebesius K, Harmsen D, Rakin A, Schmelz J, Heesemann J.** 1998. Development of rRNA-targeted PCR and in situ hybridization with fluorescently labelled oligonucleotides for detection of *Yersinia* species. *Journal of Clinical Microbiology* **36**:2557-2564.
182. **Achtman M, Zurth K, Morelli G, Torrea G, Guiyoule A, Carniel E.** 1999. *Yersinia pestis*, the cause of plague, is a recently emerged clone of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:14043-14048.
183. **Hinchliffe SJ, Isherwood KE, Stabler RA, Prentice MB, Rakin A, Nichols RA, Oyston PC, Hinds J, Titball RW, Wren BW.** 2003. Application of DNA microarrays to study the evolutionary genomics of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis*. *Genome Res* **13**:2018-2029.
184. **Morelli G, Song Y, Mazzoni CJ, Eppinger M, Roumagnac P, Wagner DM, Feldkamp M, Kusecek B, Vogler AJ, Li Y, Cui Y, Thomson NR, Jombart T, Leblois R, Lichtner P, Rahalison L, Petersen JM, Balloux F, Keim P, Wirth T, Ravel J, Yang R, Carniel E, Achtman M.** 2010. *Yersinia pestis* genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. *Nat Genet* **42**:1140-1143.
185. **Achtman M, Morelli G, Zhu P, Wirth T, Diehl I, Kusecek B, Vogler AJ, Wagner DM, Allender CJ, Easterday WR, Chenal-Francisque V, Worsham P, Thomson NR, Parkhill J, Lindler LE, Carniel E, Keim P.** 2004. Microevolution and history of the plague bacillus, *Yersinia pestis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:17837-17842.
186. **Parkhill J, Wren BW, Thomson NR, Titball RW, Holden MT, Prentice MB, Sebahia M, James KD, Churcher C, Mungall KL, Baker S, Basham D, Bentley SD, Brooks K, Cerdeno-Tarraga AM, Chillingworth T, Cronin A, Davies RM, Davis P, Dougan G, Feltwell T, Hamlin N, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Leather S, Moule S, Oyston PC, Quail M, Rutherford K, Simmonds M, Skelton J, Stevens K, Whitehead S, Barrell BG.** 2001. Genome sequence of *Yersinia pestis*, the causative agent of plague. *Nature* **413**:523-527.
187. **Chain PS, Carniel E, Larimer FW, Lamerdin J, Stoutland PO, Regala WM, Georgescu AM, Vergez LM, Land ML, Motin VL, Brubaker RR, Fowler J, Hinnebusch J, Marceau M, Medigue C, Simonet M, Chenal-Francisque V, Souza B, Dacheux D, Elliott JM, Derbise A, Hauser LJ, Garcia E.** 2004. Insights into the evolution of *Yersinia pestis* through whole-genome comparison with *Yersinia pseudotuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:13826-13831.
188. **Thomson NR, Howard S, Wren BW, Holden MTG, Crossman L, Challis GL, Churcher C, Mungall K, Brooks K, Chillingworth T, Feltwell T, Abdellah Z, Hauser H, Jagels K, Maddison M, Moule S, Sanders M, Whitehead S, Quail MA, Dougan G, Parkhill J, Prentice MB.** 2006. The complete genome sequence and comparative genome analysis of the high pathogenicity *Yersinia enterocolitica* strain 8081. *Plos Genetics* **2**:2039-2051.
189. **Reuter S, Connor TR, Barquist L, Walker D, Feltwell T, Harris SR, Fookes M, Hall ME, Petty NK, Fuchs TM, Corander J, Dufour M, Ringwood T, Savin C, Bouchier C, Martin L, Miettinen M, Shubin M, Riehm JM, Laukkanen-Ninios R, Sihvonen LM, Siitonen A, Skurnik M, Falcão JP, Fukushima H, Scholz HC, Prentice MB, Wren BW, Parkhill J, Carniel E, Achtman M, McNally A, Thomson NR.** 2014. Parallel independent evolution of pathogenicity within the genus *Yersinia*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **111**:6768-6773.
190. **Hinnebusch BJ, Erickson DL.** 2008. *Yersinia pestis* biofilm in the flea vector and its role in the transmission of plague. *Curr Top Microbiol Immunol* **322**:229-248.
191. **Cornelis GR, Boland A, Boyd AP, Geuijen C, Iriarte M, Neyt C, Sory MP, Stainier I.** 1998. The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**:1315-+.
192. **Diepold A, Wiesand U, Amstutz M, Cornelis GR.** 2012. Assembly of the *Yersinia* injectisome: the missing pieces. *Mol Microbiol* **85**:878-892.
193. **Bleves S, Cornelis GR.** 2000. How to survive in the host: the *Yersinia* lesson. *Microbes Infect* **2**:1451-1460.
194. **Edgren T, Forsberg A, Rosqvist R, Wolf-Watz H.** 2012. Type III secretion in *Yersinia*: injectisome or not? *PLoS Pathog* **8**:e1002669.
195. **Cornelis GR.** 2002. *Yersinia* type III secretion: send in the effectors. *J Cell Biol* **158**:401-408.
196. **Brubaker RR.** 2003. Interleukin-10 and inhibition of innate immunity to *Yersinia*: roles of Yops and LcrV (V antigen). *Infect Immun* **71**:3673-3681.
197. **Welkos S, Friedlander A, McDowell D, Weeks J, Tobery S.** 1998. V antigen of *Yersinia pestis* inhibits neutrophil chemotaxis. *Microb Pathog* **24**:185-196.
198. **Yang H, Tan Y, Zhang T, Tang L, Wang J, Ke Y, Guo Z, Yang X, Yang R, Du Z.** 2013. Identification of novel protein-protein interactions of *Yersinia pestis* type III secretion system by yeast two hybrid system. *PLoS One* **8**:e54121.

199. **Mukerjea R, Ghosh P.** 2013. Functionally essential interaction between *Yersinia* YscO and the T3S4 domain of YscP. *J Bacteriol* **195**:4631-4638.
200. **Marketon MM, DePaolo RW, DeBord KL, Jabri B, Schneewind O.** 2005. Plague bacteria target immune cells during infection. *Science* **309**:1739-1741.
201. **Matsumoto H, Young GM.** 2009. Translocated effectors of *Yersinia*. *Curr Opin Microbiol* **12**:94-100.
202. **Cornelis GR.** 2002. The *Yersinia* Ysc-Yop 'type III' weaponry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**:742-752.
203. **Navarro L, Alto NM, Dixon JE.** 2005. Functions of the *Yersinia* effector proteins in inhibiting host immune responses. *Curr Opin Microbiol* **8**:21-27.
204. **Mueller CA, Broz P, Müller SA, Ringler P, Erne-Brand F, Sorg I, Kuhn M, Engel A, Cornelis GR.** 2005. The V-antigen of *Yersinia* forms a distinct structure at the tip of injectisome needles. *Science* **310**:674-676.
205. **Dewoody R, Merritt PM, Marketon MM.** 2013. YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. *Mol Microbiol* **87**:301-317.
206. **Blaylock B, Berube BJ, Schneewind O.** 2010. YopR impacts type III needle polymerization in *Yersinia* species. *Mol Microbiol* **75**:221-229.
207. **Mikula KM, Kolodziejczyk R, Goldman A.** 2012. *Yersinia* infection tools-characterization of structure and function of adhesins. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:169.
208. **Heise T, Dersch P.** 2006. Identification of a domain in *Yersinia* virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:3375-3380.
209. **Eitel J, Dersch P.** 2002. The YadA protein of *Yersinia pseudotuberculosis* mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. *Infect Immun* **70**:4880-4891.
210. **Han YW, Miller VL.** 1997. Reevaluation of the virulence phenotype of the *inv yadA* double mutants of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infection and Immunity* **65**:327-330.
211. **Mota LJ, Journet L, Sorg I, Agrain C, Cornelis GR.** 2005. Bacterial injectisomes: needle length does matter. *Science* **307**:1278.
212. **Skurnik M, Wolf-Watz H.** 1989. Analysis of the *yopA* gene encoding the Yop1 virulence determinants of *Yersinia* spp. *Mol Microbiol* **3**:517-529.
213. **China B, Michiels T, Cornelis GR.** 1990. The pYV plasmid of *Yersinia* encodes a lipoprotein, YlpA, related to TraT. *Mol Microbiol* **4**:1585-1593.
214. **Hu P, Elliott J, McCready P, Skowronski E, Garnes J, Kobayashi A, Brubaker RR, Garcia E.** 1998. Structural organization of virulence-associated plasmids of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **180**:5192-5202.
215. **de Almeida AM, Guiyoule A, Guilvout I, Iteman I, Baranton G, Carniel E.** 1993. Chromosomal *irp2* gene in *Yersinia*: distribution, expression, deletion and impact on virulence. *Microb Pathog* **14**:9-21.
216. **Carniel E.** 2001. The *Yersinia* high-pathogenicity island: an iron-uptake island. *Microbes Infect* **3**:561-569.
217. **Ch'ng SL, Octavia S, Xia Q, Duong A, Tanaka MM, Fukushima H, Lan R.** 2011. Population structure and evolution of pathogenicity of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Appl Environ Microbiol* **77**:768-775.
218. **Lesic B, Carniel E.** 2005. Horizontal transfer of the high-pathogenicity island of *Yersinia pseudotuberculosis*. *J Bacteriol* **187**:3352-3358.
219. **Rakin A, Urbitsch P, Heesemann J.** 1995. Evidence for two evolutionary lineages of highly pathogenic *Yersinia* species. *J Bacteriol* **177**:2292-2298.
220. **Perry RD, Fetherston JD.** 2011. Yersiniabactin iron uptake: mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. *Microbes Infect* **13**:808-817.
221. **Darby C, Ananth SL, Tan L, Hinnebusch BJ.** 2005. Identification of *gmhA*, a *Yersinia pestis* gene required for flea blockage, by using a *Caenorhabditis elegans* biofilm system. *Infect Immun* **73**:7236-7242.
222. **Erickson DL, Jarrett CO, Wren BW, Hinnebusch BJ.** 2006. Serotype differences and lack of biofilm formation characterize *Yersinia pseudotuberculosis* infection of the *Xenopsylla cheopis* flea vector of *Yersinia pestis*. *J Bacteriol* **188**:1113-1119.
223. **Sun YC, Jarrett CO, Bosio CF, Hinnebusch BJ.** 2014. Retracing the evolutionary path that led to flea-borne transmission of *Yersinia pestis*. *Cell Host Microbe* **15**:578-586.
224. **Grassl GA, Bohn E, Müller Y, Bühler OT, Autenrieth IB.** 2003. Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasin beyond invasion. *Int J Med Microbiol* **293**:41-54.
225. **Isberg RR, Voorhis DL, Falkow S.** 1987. Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. *Cell* **50**:769-778.

226. **Felek S, Tsang TM, Krukoni ES.** 2010. Three *Yersinia pestis* adhesins facilitate Yop delivery to eukaryotic cells and contribute to plague virulence. *Infect Immun* **78**:4134-4150.
227. **Yamashita S, Lukacik P, Barnard TJ, Noinaj N, Felek S, Tsang TM, Krukoni ES, Hinnebusch BJ, Buchanan SK.** 2011. Structural insights into Ail-mediated adhesion in *Yersinia pestis*. *Structure* **19**:1672-1682.
228. **Kolodziejek AM, Hovde CJ, Minnich SA.** 2012. *Yersinia pestis* Ail: multiple roles of a single protein. *Front Cell Infect Microbiol* **2**:103.
229. **Huang XZ, Lindler LE.** 2004. The pH 6 antigen is an antiphagocytic factor produced by *Yersinia pestis* independent of *Yersinia* outer proteins and capsule antigen. *Infect Immun* **72**:7212-7219.
230. **Iriarte M, Vanooteghem JC, Delor I, Díaz R, Knutton S, Cornelis GR.** 1993. The Myf fibrillae of *Yersinia enterocolitica*. *Mol Microbiol* **9**:507-520.
231. **Lawrenz MB, Pennington J, Miller VL.** 2013. Acquisition of omptin reveals cryptic virulence function of autotransporter YapE in *Yersinia pestis*. *Mol Microbiol* **89**:276-287.
232. **Prentice MB, James KD, Parkhill J, Baker SG, Stevens K, Simmonds MN, Mungall KL, Churcher C, Oyston PC, Titball RW, Wren BW, Wain J, Pickard D, Hien TT, Farrar JJ, Dougan G.** 2001. *Yersinia pestis* pFra shows biovar-specific differences and recent common ancestry with a *Salmonella enterica* serovar Typhi plasmid. *J Bacteriol* **183**:2586-2594.
233. **Zavialov AV, Berglund J, Pudney AF, Fooks LJ, Ibrahim TM, MacIntyre S, Knight SD.** 2003. Structure and biogenesis of the capsular F1 antigen from *Yersinia pestis*: preserved folding energy drives fiber formation. *Cell* **113**:587-596.
234. **Du Y, Rosqvist R, Forsberg A.** 2002. Role of fraction 1 antigen of *Yersinia pestis* in inhibition of phagocytosis. *Infect Immun* **70**:1453-1460.
235. **Galvan EM, Lasaro MA, Schifferli DM.** 2008. Capsular antigen fraction 1 and Pla modulate the susceptibility of *Yersinia pestis* to pulmonary antimicrobial peptides such as cathelicidin. *Infect Immun* **76**:1456-1464.
236. **Hinnebusch BJ, Rudolph AE, Cherepanov P, Dixon JE, Schwan TG, Forsberg A.** 2002. Role of *Yersinia murine* toxin in survival of *Yersinia pestis* in the midgut of the flea vector. *Science* **296**:733-735.
237. **Kutyrev V, Mehig RJ, Motin VL, Pokrovskaya MS, Smirnov GB, Brubaker RR.** 1999. Expression of the plague plasminogen activator in *Yersinia pseudotuberculosis* and *Escherichia coli*. *Infect Immun* **67**:1359-1367.
238. **Sodeinde OA, Subrahmanyam YV, Stark K, Quan T, Bao Y, Goguen JD.** 1992. A surface protease and the invasive character of plague. *Science* **258**:1004-1007.
239. **Hinnebusch BJ, Fischer ER, Schwan TG.** 1998. Evaluation of the role of the *Yersinia pestis* plasminogen activator and other plasmid-encoded factors in temperature-dependent blockage of the flea. *J Infect Dis* **178**:1406-1415.
240. **Korhonen TK, Haiko J, Laakkonen L, Jarvinen HM, Westerlund-Wikstrom B.** 2013. Fibrinolytic and coagulative activities of *Yersinia pestis*. *Front Cell Infect Microbiol* **3**:35.
241. **Lahteenmaki K, Virkola R, Saren A, Emody L, Korhonen TK.** 1998. Expression of plasminogen activator pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to the mammalian extracellular matrix. *Infect Immun* **66**:5755-5762.
242. **Welkos SL, Friedlander AM, Davis KJ.** 1997. Studies on the role of plasminogen activator in systemic infection by virulent *Yersinia pestis* strain C092. *Microb Pathog* **23**:211-223.
243. **Derbise A, Chenal-Francisque V, Pouillot F, Fayolle C, Prevost MC, Medigue C, Hinnebusch BJ, Carniel E.** 2007. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol Microbiol* **63**:1145-1157.
244. **Derbise A, Chenal-Francisque V, Huon C, Fayolle C, Demeure CE, Chane-Woon-Ming B, Medigue C, Hinnebusch BJ, Carniel E.** 2010. Delineation and analysis of chromosomal regions specifying *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **78**:3930-3941.
245. **Forman S, Wulff CR, Myers-Morales T, Cowan C, Perry RD, Straley SC.** 2013. Partial Retraction: yadBC of *Yersinia pestis*, a New Virulence Determinant for Bubonic Plague.
246. **Maurelli AT, Fernandez RE, Bloch CA, Rode CK, Fasano A.** 1998. "Black holes" and bacterial pathogenicity: a large genomic deletion that enhances the virulence of *Shigella* spp. and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:3943-3948.
247. **Simonet M, Riot B, Fortineau N, Berche P.** 1996. Invasin production by *Yersinia pestis* is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene. *Infect Immun* **64**:375-379.
248. **Sebbane F, Devalckenaere A, Foulon J, Carniel E, Simonet M.** 2001. Silencing and reactivation of urease in *Yersinia pestis* is determined by one G residue at a specific position in the ureD gene. *Infect Immun* **69**:170-176.

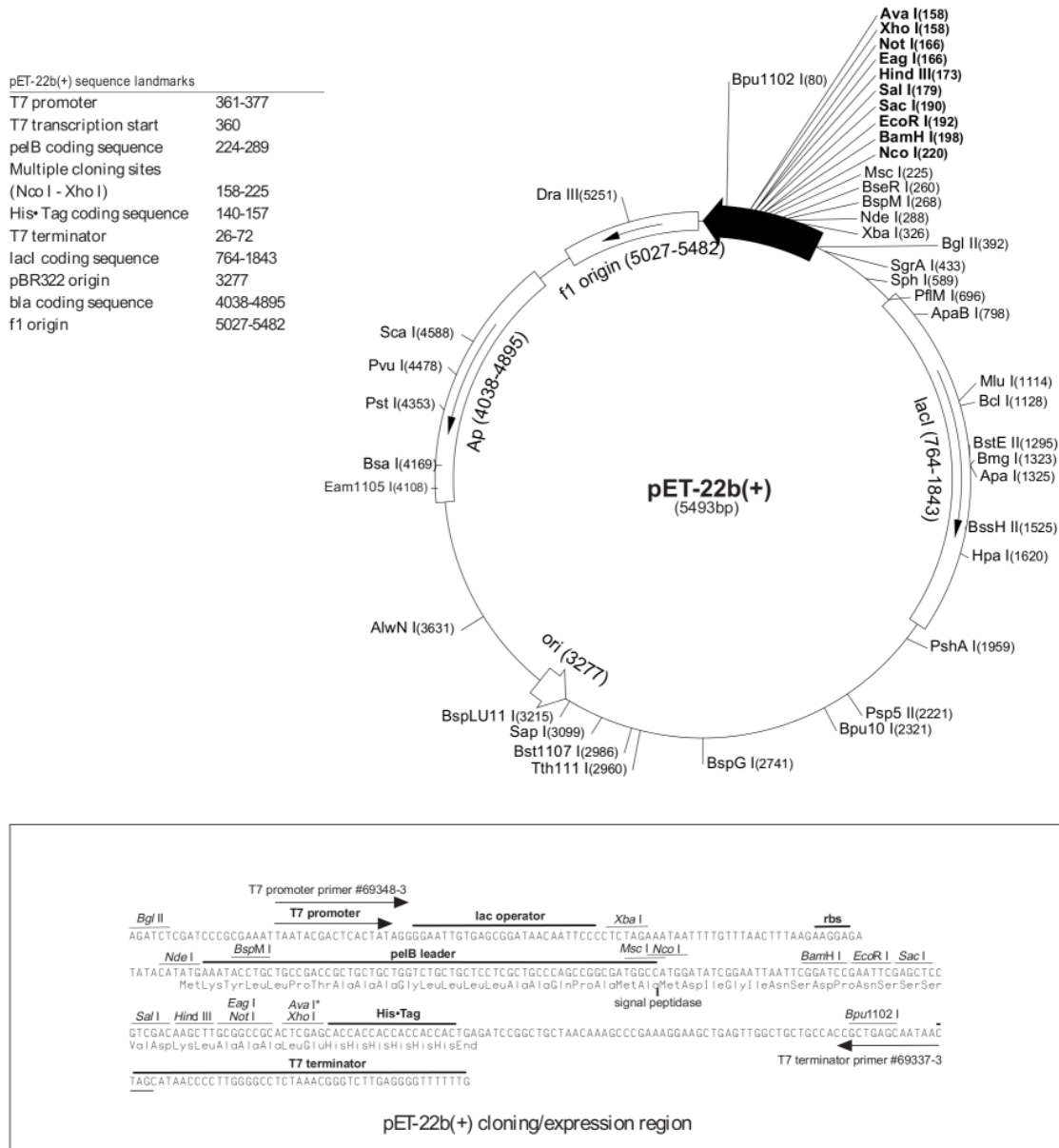
249. **Knirel YA, Anisimov AP.** 2012. Lipopolysaccharide of *Yersinia pestis*, the Cause of Plague: Structure, Genetics, Biological Properties. *Acta Naturae* **4**:46-58.
250. **Wren BW.** 2003. The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. *Nat Rev Microbiol* **1**:55-64.
251. **Pouillot F, Fayolle C, Carniel E.** 2008. Characterization of chromosomal regions conserved in *Yersinia pseudotuberculosis* and lost by *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **76**:4592-4599.
252. **Chauvaux S, Dillies MA, Marceau M, Rosso ML, Rousseau S, Moszer I, Simonet M, Carniel E.** 2011. In silico comparison of *Yersinia pestis* and *Yersinia pseudotuberculosis* transcriptomes reveals a higher expression level of crucial virulence determinants in the plague bacillus. *Int J Med Microbiol* **301**:105-116.
253. **Yersin A, Calmette A, Amédée B.** 1895. La peste bubonique (deuxième note). *Ann Inst Pasteur* **9**:589-592.
254. **Haffkine WM.** 1897. Remarks on the Plague Prophylactic Fluid. *Br Med J* **1**:1461-1462.
255. **Titball RW, Williamson ED.** 2001. Vaccination against bubonic and pneumonic plague. *Vaccine* **19**:4175-4184.
256. **Valentina AF, Vladimir LM.** 2012. Plague vaccines: current developments and future perspectives. *Emerging Microbes & Infections* **1**.
257. **Rosenzweig JA, Jejelowo O, Sha J, Erova TE, Brackman SM, Kirtley ML, van Lier CJ, Chopra AK.** 2011. Progress on plague vaccine development. *Appl Microbiol Biotechnol* **91**:265-286.
258. **Blisnick T, Ave P, Huerre M, Carniel E, Demeure CE.** 2008. Oral vaccination against bubonic plague using a live avirulent *Yersinia pseudotuberculosis* strain. *Infection and Immunity* **76**:3808-3816.
259. **Williamson ED, Oyston PC.** 2013. Protecting against plague: towards a next-generation vaccine. *Clin Exp Immunol* **172**:1-8.
260. **Hart MK, Saviolakis GA, Welkos SL, House RV.** 2011. Advanced Development of the rF1V and rBV A/B Vaccines: Progress and Challenges. *Advances in Preventive Medicine* **2012**.
261. **Sun W, Roland KL, Curtiss R, 3rd.** 2011. Developing live vaccines against plague. *J Infect Dev Ctries* **5**:614-627.
262. **Derbise A, Cerda Marin A, Ave P, Blisnick T, Huerre M, Carniel E, Demeure CE.** 2012. An encapsulated *Yersinia pseudotuberculosis* is a highly efficient vaccine against pneumonic plague. *PLoS Negl Trop Dis* **6**:e1528.
263. **Meyer KF, Hightower JA, McCrumb FR.** 1974. Plague immunization. VI. Vaccination with the fraction I antigen of *Yersinia pestis*. *J Infect Dis* **129**:Suppl:S41-45.
264. **Meyer KF, Foster LE.** 1948. Measurement of protective serum antibodies in human volunteers inoculated with plague prophylactics. *Stanford Med Bull* **6**:75-79.
265. **Anderson GW, Worsham PL, Bolt CR, Andrews GP, Welkos SL, Friedlander AM, Burans JP.** 1997. Protection of mice from fatal bubonic and pneumonic plague by passive immunization with monoclonal antibodies against the F1 protein of *Yersinia pestis*. *Am J Trop Med Hyg* **56**:471-473.
266. **Burrows TW, Bacon GA.** 1958. The effects of loss of different virulence determinants on the virulence and immunogenicity of strains of *Pasteurella pestis*. *Br J Exp Pathol* **39**:278-291.
267. **Motin VL, Nakajima R, Smirnov GB, Brubaker RR.** 1994. Passive immunity to yersiniae mediated by anti-recombinant V antigen and protein A-V antigen fusion peptide. *Infect Immun* **62**:4192-4201.
268. **Hill J, Leary SE, Griffin KF, Williamson ED, Titball RW.** 1997. Regions of *Yersinia pestis* V antigen that contribute to protection against plague identified by passive and active immunization. *Infect Immun* **65**:4476-4482.
269. **Hill J, Copse C, Leary S, Stagg AJ, Williamson ED, Titball RW.** 2003. Synergistic protection of mice against plague with monoclonal antibodies specific for the F1 and V antigens of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **71**:2234-2238.
270. **Hill J, Eyles JE, Elvin SJ, Healey GD, Lukaszewski RA, Titball RW.** 2006. Administration of antibody to the lung protects mice against pneumonic plague. *Infect Immun* **74**:3068-3070.
271. **Eisele NA, Anderson DM.** 2009. Dual-function antibodies to *Yersinia pestis* LcrV required for pulmonary clearance of plague. *Clin Vaccine Immunol* **16**:1720-1727.
272. **Sofer-Podesta C, Ang J, Hackett NR, Senina S, Perlin D, Crystal RG, Boyer JL.** 2009. Adenovirus-mediated delivery of an anti-V antigen monoclonal antibody protects mice against a lethal *Yersinia pestis* challenge. *Infect Immun* **77**:1561-1568.
273. **Xiao X, Zhu Z, Dankmeyer JL, Wormald MM, Fast RL, Worsham PL, Cote CK, Amemiya K, Dimitrov DS.** 2010. Human anti-plague monoclonal antibodies protect mice from *Yersinia pestis* in a bubonic plague model. *PLoS One* **5**:e13047.
274. **Swietnicki W, Powell BS, Goodin J.** 2005. *Yersinia pestis* Yop secretion protein F: purification, characterization, and protective efficacy against bubonic plague. *Protein Expr Purif* **42**:166-172.

275. **Matson JS, Durick KA, Bradley DS, Nilles ML.** 2005. Immunization of mice with YscF provides protection from *Yersinia pestis* infections. *BMC Microbiol* **5**:38.
276. **Pettersson J, Holmström A, Hill J, Leary S, Frithz-Lindsten E, von Euler-Matell A, Carlsson E, Titball R, Forsberg A, Wolf-Watz H.** 1999. The V-antigen of *Yersinia* is surface exposed before target cell contact and involved in virulence protein translocation. *Mol Microbiol* **32**:961-976.
277. **Weeks S, Hill J, Friedlander A, Welkos S.** 2002. Anti-V antigen antibody protects macrophages from *Yersinia pestis* -induced cell death and promotes phagocytosis. *Microb Pathog* **32**:227-237.
278. **Noel BL, Lilo S, Capurso D, Hill J, Bliska JB.** 2009. *Yersinia pestis* can bypass protective antibodies to LcrV and activation with gamma interferon to survive and induce apoptosis in murine macrophages. *Clin Vaccine Immunol* **16**:1457-1466.
279. **Ivanov MI, Hill J, Bliska JB.** 2014. Direct neutralization of type III effector translocation by the variable region of a monoclonal antibody to *Yersinia pestis* LcrV. *Clin Vaccine Immunol* **21**:667-673.
280. **Quenee LE, Berube BJ, Segal J, Elli D, Ciletti NA, Anderson D, Schneewind O.** 2010. Amino acid residues 196-225 of LcrV represent a plague protective epitope. *Vaccine* **28**:1870-1876.
281. **Philipovskiy AV, Cowan C, Wulff-Strobel CR, Burnett SH, Kerschen EJ, Cohen DA, Kaplan AM, Straley SC.** 2005. Antibody against V antigen prevents Yop-dependent growth of *Yersinia pestis*. *Infect Immun* **73**:1532-1542.
282. **Cowan C, Philipovskiy AV, Wulff-Strobel CR, Ye Z, Straley SC.** 2005. Anti-LcrV antibody inhibits delivery of Yops by *Yersinia pestis* KIM5 by directly promoting phagocytosis. *Infect Immun* **73**:6127-6137.
283. **Keller MA, Stiehm ER.** 2000. Passive immunity in prevention and treatment of infectious diseases. *Clin Microbiol Rev* **13**:602-614.
284. **Froude JW, Stiles B, Pelat T, Thullier P.** 2011. Antibodies for biodefense. *MAbs* **3**:517-527.
285. **Ramalingaswami V.** 2001. Psychosocial effects of the 1994 plague outbreak in Surat, India. *Mil Med* **166**:29-30.
286. **Schmidt M, Sethi KK.** 1987. Production and characterization of monoclonal antibodies specific for pathogenic serogroups O:3, O:8, and O:9 of *Yersinia enterocolitica*. *Zentralbl Bakteriol Mikrobiol Hyg A* **265**:113-123.
287. **Kaneko S, Maruyama T.** 1989. Evaluation of enzyme immunoassay for the detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **27**:748-751.
288. **Hochel I, Skvor J.** 2007. Characterization of rabbit antibodies for immunochemical detection of *Yersinia enterocolitica*. *Folia Microbiol (Praha)* **52**:511-518.
289. **Balakrishna K, Radhika M, Murali HS, Batra HV, Bawa AS.** 2012. Specific identification of pathogenic *Yersinia enterocolitica* by monoclonal antibodies generated against recombinant attachment invasion locus (rAil) protein. *World J Microbiol Biotechnol* **28**:533-539.
290. **Wong RC, Tse HY.** 2009. Lateral Flow Immunoassay. Humana Press.
291. **Nato F, Phalipon A, Nguyen TL, Diep TT, Sansonetti P, Germani Y.** 2007. Dipstick for rapid diagnosis of *Shigella flexneri* 2a in stool. *PLoS One* **2**:e361.
292. **Taneja N, Nato F, Darteville S, Sire JM, Garin B, Thi Phuong LN, Diep TT, Shako JC, Bimet F, Filliol I, Muyembe JJ, Ungeheuer MN, Ottone C, Sansonetti P, Germani Y.** 2011. Dipstick test for rapid diagnosis of *Shigella dysenteriae* 1 in bacterial cultures and its potential use on stool samples. *PLoS One* **6**:e24830.
293. **Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guénolé A, Bhuiyan NA, Sack DA, Nair GB, Fournier JM, Chanteau S.** 2003. One-step immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and O139 in stool samples. *Clin Diagn Lab Immunol* **10**:476-478.
294. **Kohler G, Milstein C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* **256**:495-497.
295. **Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
296. **Frank R.** 2002. The SPOT-synthesis technique: Synthetic peptide arrays on membrane supports—principles and applications. *Journal of Immunological Methods* **267**:13-26.
297. **Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE.** 1989. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta. Development of two enzyme immunoassays (EIA) using acetylcholinesterase and their application to biological media. *J Immunol Methods* **123**:193-210.
298. **Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM.** 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* **7**:88-95.
299. **Pradelles P, Grassi J, Maclouf J.** 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. *Anal Chem* **57**:1170-1173.

300. **Koster M, Bitter W, de Cock H, Allaoui A, Cornelis GR, Tommassen J.** 1997. The outer membrane component, YscC, of the Yop secretion machinery of *Yersinia enterocolitica* forms a ring-shaped multimeric complex. *Mol Microbiol* **26**:789-797.
301. **Davis AJ, Mecsas J.** 2007. Mutations in the *Yersinia pseudotuberculosis* type III secretion system needle protein, YscF, that specifically abrogate effector translocation into host cells. *J Bacteriol* **189**:83-97.
302. **Ali R, Kumar S, Naqvi RA, Rao DN.** 2013. B and T cell epitope mapping and study the humoral and cell mediated immune response to B-T constructs of YscF antigen of *Yersinia pestis*. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **36**:365-378.
303. **Kowal J, Chami M, Ringler P, Muller SA, Kudryashev M, Castano-Diez D, Amstutz M, Cornelis GR, Stahlberg H, Engel A.** 2013. Structure of the dodecameric *Yersinia enterocolitica* secretin YscC and its trypsin-resistant core. *Structure* **21**:2152-2161.
304. **Heinz DW.** 2013. Secrets of a secretin. *Structure* **21**:2098-2099.
305. **Diepold A, Amstutz M, Abel S, Sorg I, Jenal U, Cornelis GR.** 2010. Deciphering the assembly of the *Yersinia* type III secretion injectisome. *Embo j* **29**:1928-1940.
306. **Akopyan K, Edgren T, Wang-Edgren H, Rosqvist R, Fahlgren A, Wolf-Watz H, Fallman M.** 2011. Translocation of surface-localized effectors in type III secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:1639-1644.
307. **Miller NC, Quenee LE, Elli D, Ciletti NA, Schneewind O.** 2012. Polymorphisms in the *lcrV* Gene of *Yersinia enterocolitica* and Their Effect on Plague Protective Immunity. *Infection and Immunity* **80**:1572-1582.
308. **Pullen JK, Anderson GW, Jr., Welkos SL, Friedlander AM.** 1998. Analysis of the *Yersinia pestis* V protein for the presence of linear antibody epitopes. *Infect Immun* **66**:521-527.
309. **Hill J, Leary S, Smither S, Best A, Pettersson J, Forsberg A, Lingard B, Lipka A, Brown KA, Williamson ED, Titball RW.** 2009. N255 is a key residue for recognition by a monoclonal antibody which protects against *Yersinia pestis* infection. *Vaccine* **27**:7073-7079.
310. **Flashner Y, Fisher M, Tidhar A, Mechaly A, Gur D, Halperin G, Zahavy E, Mamroud E, Cohen S.** 2010. The search for early markers of plague: evidence for accumulation of soluble *Yersinia pestis* LcrV in bubonic and pneumonic mouse models of disease. *Fems Immunology and Medical Microbiology* **59**:197-206.
311. **Anisimov AP, Lindler LE, Pier GB.** 2004. Intraspecific diversity of *Yersinia pestis*. *Clinical Microbiology Reviews* **17**:434-+.
312. **Gomes-Solecki MJC, Savitt AG, Rowehl R, Glass JD, Bliska JB, Dattwyler RJ.** 2005. LcrV capture enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Yersinia pestis* from human samples. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology* **12**:339-346.
313. **Chart H, Rowe B.** 1991. Purification of lipopolysaccharide from strains of *Yersinia enterocolitica* belonging to serogroups O3 and O9. *FEMS microbiology letters* **61**:341-345.
314. **Skurnik M, Bengoechea JA.** 2003. Biosynthesis and biological role of lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic *Yersiniae*. *Carbohydrate Research* **338**:2521-2529.
315. **Schiemann DA.** 1979. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterocolitica*. *Can J Microbiol* **25**:1298-1304.
316. **Chenais E, Bagge E, Lambertz ST, Artursson K.** 2012. *Yersinia enterocolitica* serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive reactions for *Brucella melitensis*. *Infection ecology & epidemiology* **2**.
317. **Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C.** 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock and Wildlife. *Croatian Medical Journal* **51**:296-305.
318. **Bari ML, Hossain MA, Isshiki K, Ukuku D.** 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. *J Pathog* **2011**:420732.

ANNEXES

Annexe 1 : Carte de restriction du vecteur pET-22b(+) (Novagen)



Annexe 2 : Article « Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays ». Journal of Clinical Microbiology.

1 **Fast and sensitive detection of enteropathogenic *Yersinia* by immunoassays**

2

3

4 Jérôme Laporte,^a Cyril Savin,^b Patricia Lamourette,^a Karine Devilliers,^b Hervé Volland,^a

5 Elisabeth Carniel,^b Christophe Créminon,^a Stéphanie Simon^{a#}

6

7 CEA Saclay, iBiTec-S, Service de Pharmacologie et d'Immunoanalyse, Laboratoire d'Etudes

8 et de Recherches en Immunoanalyse, Gif sur Yvette, France^a; Institut Pasteur, *Yersinia*

9 Research Unit, National Reference Laboratory and WHO collaborating Center, Paris, France ^b

10

11 Running title: Detection of enteropathogenic *Yersinia*

12

13 #Address correspondence to Stéphanie Simon, stephanie.simon@cea.fr

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

Abstract

27

28 *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, the two enteropathogenic *Yersinia*
 29 species for humans are worldwide distributed and are causing frequently diarrhea to
 30 inhabitants of temperate and cold countries. *Yersinia enterocolitica* is a major cause of
 31 foodborne disease, by consumption of contaminated pork meat further associated substantial
 32 economic cost. However, investigating enteropathogenic *Yersinia* is hardly performed
 33 routinely in clinical laboratories because of their specific growth characteristics, which make
 34 difficult their isolation from stools samples. Moreover, current isolation procedures are time
 35 consuming and expensive, thus leading to underestimated incidence of enteric yersiniosis,
 36 inappropriate prescriptions of antibiotic treatments and unnecessary appendectomies. The
 37 main objective of the study was to develop fast, sensitive, specific and easy-to-use
 38 immunoassays, useful for both human and veterinary diagnosis. Monoclonal antibodies
 39 (mAbs) directed against *Y. enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3 and
 40 *Y. pseudotuberculosis* serotypes I and III were produced. Pairs of mAbs were selected by
 41 testing their specificity and affinity toward enteropathogenic *Yersinia* and other commonly
 42 found enterobacteria. Pairs of mAbs were selected to develop highly sensitive enzyme
 43 immunoassays (EIA) and lateral flow immunoassays (LFI or dipsticks) convenient for rapid
 44 diagnostic purpose. The limit of detection of the EIAs ranged from 3.2×10^3 cfu/ml to $8.8 \times$
 45 10^4 cfu/ml for pathogenic serotypes I and III of *Y. pseudotuberculosis* and pathogenic
 46 bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3 of *Y. enterocolitica* and ranged for the LFIs from 10^5 cfu/ml to
 47 10^6 cfu/ml. A similar limit of detection was observed for artificially contaminated human
 48 feces.

49

50

51 Introduction

52

53 The genus *Yersinia* belongs to the family of *Enterobacteriaceae* and is composed of three
 54 human pathogenic species: *Yersinia pestis*, the causative agent of the plague, *Yersinia*
 55 *enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*, responsible for human enteric yersiniosis.
 56 Enteric yersiniosis is a foodborne disease caused by consumption of contaminated food or
 57 water (1) and can be transmitted between humans through the fecal-oral route. The disease is
 58 usually characterized by a self-limiting acute infection beginning in the intestine and often
 59 limited to the ileocecal junction for *Y. enterocolitica*. On the contrary, *Y. pseudotuberculosis*
 60 often disseminates deeply to the mesenteric lymph nodes. Clinical presentation is
 61 characterized by an enterocolitis (diarrhea, abdominal pain, fever, and sometimes vomiting)
 62 (2), which predominates in young children and is often self-limiting. However, diarrhea is a
 63 predominant symptom of *Y. enterocolitica* infection while abdominal pain is more usual in
 64 *Y. pseudotuberculosis* infection. Moreover, *Y. pseudotuberculosis* can also cause different
 65 clinical symptoms as scarlatinoid rash, conjunctivitis, acute organ failure and toxic shock
 66 syndrome often reported in Far East (3). For both enteropathogenic *Yersinia*, more serious
 67 infections and sepsis can also occur, particularly in new-born, elderly and
 68 immunocompromised patients. Sometimes, the infection appears as a pseudo-appendicular
 69 syndrome where mesenteric lymph nodes are involved, thus possibly leading to unnecessary
 70 appendectomies (4). Some secondary complications such as reactive arthritis and erythema
 71 nodosum are sometimes observed (5, 6). Rarely, *Y. enterocolitica* is responsible for serious
 72 sepsis incident after transfusion of contaminated red blood cell preparations (7).

73 *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* are widespread worldwide, with a higher
 74 incidence in cold and temperate regions. Most *Y. enterocolitica* strains associated with human
 75 yersiniosis belong to bioserotypes 2/O:9, 4/O:3, 2/O:5,27, 3/O:3 and 1B/O:8 (8). In France

76 and worldwide, serotypes 2/O:9 and 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* serotypes I and III are
 77 the prevailing isolated strains (9). The incidence of human enteric yersiniosis has been
 78 estimated to 16, 1.65 and 0.35 per 100,000 inhabitants in France (10), Europe (11), and the
 79 USA (12) respectively, but is probably largely underestimated for many reasons.
 80 *Y. enterocolitica* is the third causative agent of diarrhea of bacterial origin in France and
 81 Europe after *Campylobacter* and *Salmonella* (11). Even if the incidence of
 82 *Y. pseudotuberculosis* is lower, it represents a major public health problem in some countries
 83 such as Japan or Russia, where it causes a particular and severe infection known as Far East
 84 Scarlet-Like Fever or Izumi Fever (13, 14) and in Finland, where multiple outbreaks were
 85 observed (15). In France, a sudden onset of *Y. pseudotuberculosis* infections was reported
 86 between 2004 and 2005 (16).

87 Nowadays, diagnosis of enteric yersiniosis is performed by a direct isolation of
 88 enteropathogenic *Yersinia* from stools cultures together with an enrichment in a specific broth
 89 before an isolation on a semi selective media known as Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin
 90 medium (CIN). Since *Yersinia* strains differ from other enterobacteria by a lower growth rate
 91 and a different optimal growth temperature (28°C instead of 37°C), stools cultures performed
 92 at 37°C for 24 h (optimal conditions for most enterobacteria) are not efficient for recovering
 93 *Yersinia* colonies in the commensal flora. Moreover, isolation, even performed on selective
 94 media, needs time-consuming enrichment steps and is poorly successful for
 95 *Y. pseudotuberculosis* (17). Finally the diagnosis of enteropathogenic bacteria is generally not
 96 required by the physicians due to the lack of knowledge about these pathogens. However,
 97 clinical laboratories are more and more conscious of the enteropathogenic *Yersinia* issues and
 98 are disposed to perform systematic analysis on feces samples.

99 After isolation of a bacterial colony, identification of the *Yersinia* species is achieved by a
 100 biochemical characterization with commercial systems like API 20E or 50CH (BioMérieux).

101 For *Y. enterocolitica*, determination of the biotype is necessary to assess the pathogenicity of
 102 the strain and it is based on a biotype scheme involving supplementary biochemical
 103 characterizations (18). For *Y. pseudotuberculosis*, as all strains are considered pathogenic,
 104 determination of the biotype is not done. Furthermore, the characterization of serotypes for
 105 both enteropathogenic *Yersinia* can be achieved by sero-agglutination of strains. However,
 106 this technique is only available in specialized laboratories and serotypes are not necessary
 107 related to the pathogenicity of *Y. enterocolitica* (19). Some molecular techniques like DNA
 108 colony hybridization, PCR, real-time PCR, multilocus sequence typing (MLST) or pulsed-
 109 field gel electrophoresis (PFGE) have been developed but only PCR techniques are used for
 110 detection (20). However most of these techniques need isolation of the bacteria or an
 111 enrichment step to avoid inhibition due to complex composition of stools samples (21) and
 112 may also require specific devices possibly not present in clinical laboratories (8, 22). Until
 113 now, there is no available standard procedure for identification of all enteropathogenic
 114 *Yersinia*.

115 New diagnostic tools are needed to complete the currently gold standard tests, i.e.
 116 microbiological methods that are quite time-consuming. Ideally, these tests should be fast,
 117 sensitive, specific, efficient on fecal samples, inexpensive and user-friendly. Among
 118 analytical methods, immunoassays are simple to perform, particularly lateral flow
 119 immunoassays. Some lateral flow immunoassays have already been successfully developed
 120 for *Yersinia pestis* (23, 24), *Vibrio cholerae* (25) and other enterobacteria like *Shigella* (26,
 121 27). The aim of this study was thus to develop sensitive and specific immunoassays using
 122 either enzyme immunoassay format (EIA) or a lateral flow immunoassay format (LFI or
 123 dipstick), targeting the enteropathogenic *Yersinia*, for rapid and simple diagnosis in human
 124 samples. Monoclonal antibodies (mAbs) were thus raised against two *Y. enterocolitica*
 125 bioserotypes (2/O:9 and 4/O:3) and two *Y. pseudotuberculosis* serotypes (I and III).

126

127 **Materials and methods**

128

129 **Ethics statement.** All experiments were performed in compliance with the French and
 130 European regulations on care and protection of Laboratory Animals (EC Directive 86/609,
 131 French Law 2001-486, June 6, 2001) with agreement n°91-416 delivered to Dr. S. Simon by
 132 the French Veterinary Services and CEA agreement D-91-272-106 from the Veterinary
 133 Inspection Department of Essonne (France).

134 No ethics approval and written consent were necessary because the human sample was
 135 recovered from the first author of the manuscript. A verbal informed consent of the first
 136 author was obtained.

137

138 **Reagents.** Biotin N-hydroxysuccinimide ester, streptavidin, gold chloride solution and N-
 139 succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA) were from Sigma-Aldrich. Goat Anti-mouse
 140 Ig(G+M) polyclonal antibodies were from Jackson ImmunoResearch. Proteinase K was from
 141 Bio-Rad. Stabilized goat anti-mouse IgG (H+L) Horse Radish Peroxidase (HRP)
 142 conjugated was from Thermo Fisher. The PVDF membrane for western-blotting was from
 143 Amersham Biosciences. The Luminata Forte Western HRP substrate and Protein A sepharose
 144 were from Millipore (ProsepA). EIA was performed with Maxisorp 96-well microtiter plates
 145 (Nunc) and all reagents were diluted in EIA buffer (0.1 M phosphate buffer pH 7.4 containing
 146 0.15 M NaCl, 0.1% bovine serum albumin and 0.01% sodium azide). Plates coated with
 147 proteins were saturated in EIA buffer (18 h at 4°C) and washed with washing buffer (0.01 M
 148 potassium phosphate pH 7.4 containing 0.05% Tween 20).

149

Strains and growth conditions. The bacterial strains used in this study are listed in Table 1 and Table 2. All enterobacteria (*Yersinia*, *E. coli*, *Shigella*, *Salmonella*) were grown in Luria Bertani Broth (LB) and *Brucella* species were grown in Trypcase Soy Agar (TSA) with 5% of sheep blood (BioMérieux). Growth temperatures were 28°C or 37°C for *Yersinia* strains and 37°C for other bacteria. Before performing the assays, all strains were grown overnight in 5 ml LB broth under agitation at 28°C or 37°C. Bacteria were subcultured with 1:100 of the first culture for 4 h under the same conditions.

Production of monoclonal antibodies. Ten weeks-old female Biozzi mice were immunized monthly for 3 months by injection into the foot pad of 10^9 heat-inactivated *Yersinia* cultured at 37°C to simulate temperature conditions before an infection. Mice were bled before the first immunization (S0, used as negative control) and two weeks after each injection (S1, S2 and S3). The immune polyclonal response was evaluated by ELISA using enteropathogenic *Yersinia* strains as coated antigens (see section Enzyme immunoassays). The two mice presenting the highest ELISA titer were selected for preparation of mAbs and given two intravenous booster injections of 10^9 CFU of heat-killed bacteria two months after the last immunization. Two days after the last boost, spleen cells from mice were fused with myeloma NS1 cells as previously described (28). The hybridomas culture supernatants were screened for the presence of anti-*Yersinia* antibodies by ELISA (see section Enzyme immunoassays). Selected hybridomas were subsequently cloned by limiting dilution, and mAbs were obtained after inducing ascitic fluid in BALB/c mice. MAb were further purified by affinity chromatography using protein A and dialysed in 0.05 M phosphate buffer pH 7.4. Purity was assessed by SDS-PAGE and Coomassie Blue staining.

In this study, mAbs obtained after immunization with *Y. enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 or 4/O:3 were called Ye and mAbs obtained after immunization with *Y. pseudotuberculosis*

175 serotypes I or III were called Yps. MAbs called Yp were obtained from a previous study
 176 (unpublished work) after immunization with *Y. pestis*.

177

178 **Enzyme immunoassays**

179 ***Evaluation of polyclonal response and screening of mAbs in hybridoma supernatants.***

180 Anti-*Yersinia* antibodies were detected in sera of immunized mice or hybridoma culture
 181 supernatants using ELISA. Briefly, 50 µl of 2×10^8 cfu/ml of enterobacteria in sterile water
 182 were added to each well of microtiter plates and allowed to dry overnight (ON) at room
 183 temperature (RT). The plates were then saturated with 300 µl/well of EIA buffer ON at 4°C.
 184 After a washing cycle with the washing buffer, the plates were incubated with 100 µl/well of
 185 each hybridoma culture supernatant or serial dilutions of mice sera for 2h at RT. The plates
 186 were then washed before adding 100 µl of acetylcholinesterase (AChE, EC 3.1.1.7) labeled
 187 anti-mouse Ig(G+M) conjugate (2 Ellman units [EU]/ml (29)) to each well (for AChE
 188 labeling, see below). After 2 h incubation at RT followed by three washing cycles, 200 µl of
 189 Ellman's reagent (30) were added, and the absorbance was measured at 414 nm after 30 min
 190 of reaction.

191 ***Labeling with biotin.*** 0.67 nmole of mAb in 400 µl of borate buffer 0.1 M pH 8.5 were
 192 incubated at a 1:20 molar ratio with biotin-N-hydroxysuccinimide ester (13.3 nmoles)
 193 dissolved in 6 µl of anhydrous dimethylformamide (DMF). The reaction was stopped after 30
 194 min at RT by adding 100 µl of 1 M Tris-HCl pH 8 for 30 min. Finally, 500 µl of EIA buffer
 195 were added and this preparation was stored frozen at -20°C until use.

196 ***Labeling with acetylcholinesterase (AChE).*** The labeling was performed as described in
 197 (31). In this procedure, mAbs of IgG1 isotype (Ye18 and Yps104) were fragmented and
 198 reduced to Fab' fragments in order to make thiol groups accessible, and mAbs of IgG2b
 199 isotype (Ye300 and Yps2) were thiolated with N-succinimidyl-S-acetyl-thioacetate (SATA).

200 Maleimide groups were introduced into the tetrameric form (G4) of AChE by reaction with
 201 N-succinimidyl-4-(N-maleimidomethyl)cyclohexane-1-carboxylate (SMCC). MAbs were
 202 then coupled covalently to AChE by the reaction of the thiol groups with the maleimide
 203 groups.

204 ***Evaluation of the best mAbs pairs.*** To select the best mAbs pairs to develop two-site
 205 immunometric tests, a combinatorial analysis was carried out using each mAb either as
 206 capture or tracer mAb. Immobilization of the capture mAb in microtiter plates was performed
 207 overnight at RT after distributing 120 µl/well of the mAb at a concentration of 10 µg/ml in
 208 potassium phosphate buffer 0.05 M pH 7.4. The plates were then emptied, saturated with 300
 209 µl/well of EIA buffer and kept at 4°C until use (within one year). Before use, saturated plates
 210 were washed once with washing buffer. Overnight cultures of *Yersinia* and other
 211 enterobacteria were adjusted to an optical density of 1 at 600 nm (corresponding
 212 approximately to 5×10^8 cfu/ml) in EIA buffer. Then, 50 µl/well of serial dilutions of bacteria
 213 together with 50 µl/well of biotin-labeled mAb as tracer (500 ng/ml) were distributed in
 214 duplicates in the microtiter plates coated with the various capture antibodies to be tested. EIA
 215 buffer was used as a negative control. After an ON incubation at 4°C and three washing
 216 cycles, 100 µl/well of AChE-labeled streptavidin (2 Ellman units/ml) were added for 2 h at
 217 RT. Plates were then washed 3 times before adding 200 µl/well of Ellman's reagent and
 218 measuring the absorbance at 414 nm after 30 min at RT. For the following EIA, 100 µl of the
 219 bacterial sample with 100 µl of AChE-labeled mAb (2 or 5 EU/ml final concentration) were
 220 distributed in duplicates into the wells in order to obtain a better sensitivity. Microtiter plates
 221 were optionally centrifuged for 5 min at 1,000 x g and incubated for 30 min or 3 h at RT.
 222 After three washing cycles, 200 µl/well of Ellman's reagent were added and the plates were
 223 kept at RT for 30 min before absorbance measurement at 414 nm. Each measure was
 224 performed three times independently. The five-parameter logistic fit (5-PL) function

(GraphPad Prism 5) was used to fit the standard curve. The limit of detection (LoD) was calculated as the concentration providing a signal corresponding to the average background signal (as measured for 8 wells) plus 3 standard deviations.

Statistical analysis. Statistical significance was assessed using an unpaired *t* test for comparison between values of signals. Results were considered statistically significant when *P* values of < 0.05 were obtained.

Western blot experiments. Bacterial cultures of *Yersinia* grown at 28°C to obtain similar immunogenicity of the *in vivo* lipopolysaccharide (LPS) (32). Cells were suspended in Laemmli buffer containing 2% SDS and separated in two samples. One sample was treated with Proteinase K (80 µg/ml) during 30 min at 37°C. All samples were then denatured for 5 min at 95°C, and 10^7 to 10^8 cfu per well were subjected to SDS-PAGE for 1 h 30 min at 150 V in a 16% gel. Transfer onto a PVDF membrane was performed ON at RT at 25 V. For saturation step, the membrane was blocked with TBS containing 0.1% Tween 20 (TBST) with 5% skimmed dry milk during 30 min at RT. After two washes in TBST, specific mAbs (4 µg/ml in TBST containing 1% skimmed dry milk) were incubated for 30 min at RT with the membrane. After three washes in TBST, the membrane was incubated for 20 min at RT with HRP labeled polyclonal goat anti-mouse immunoglobulins diluted to 1:5000 in TBST containing 3% skimmed dry milk. After three washes in TBST and a brief wash in TBS, bands were detected by chemiluminescence.

Lateral flow immunoassays. The colloidal-gold-labeled mAb was prepared by adding 25 µg of mAb to 1 ml of colloidal gold before mixing with 100 µl of 0.02 M borax buffer, pH 9.3. The reaction mixture was incubated for 1 h in the dark at RT. Then 100 µl of 0.02 M borax buffer, pH 9.3, containing 1% BSA were added and the mixture was centrifuged at 15,000 x *g*

for 50 min at 20°C. The supernatant was discarded and the pellet was suspended in 250 µl of 0.002 M borax buffer, pH 9.3, containing 1% BSA, sonicated for a few seconds, and stored at 4°C in the dark until use. The strips (0.5 cm width and 4.5 cm length), were composed of 3 parts (33): (i) a sample pad (0.5 cm length; Standard 14, Whatman), (ii) a nitrocellulose membrane (2.5 cm length; Prima 40 or Hi-Flow Plus 75, Whatman and Millipore respectively), and (iii) an absorption pad (1.5 cm length, Cellulose grade 470, Whatman), all attached to a backing card. The detection zone contained immobilized goat anti-mouse antibodies as control line and an anti-*Yersinia* mAb as test line (1 or 2 mg/ml in 0.05 M sodium phosphate buffer, pH 7.4) dispensed at 1 µl/cm using an automatic dispenser (Airjet XYZ 3050, BioDot). After drying for 1 h at 40°C in an air oven, the membrane was incubated with a blocking solution (PBS pH 7.4 containing 0.5% BSA) for 30 min at RT. The membrane was washed twice with deionized water, incubated for 20 min at RT in a preserving solution (PBS containing 0.1% Tween 20 and 7.5% glucose) and then dried for 20 min at 40°C in an air oven. After fixing the absorption pad and the sample pad to the top and the bottom of the membrane respectively, the card was cut into strips of 5 mm width using an automatic programmable cutter (Guillotine Cutting, CM4000, BioDot). During experiment, 100 µl of bacterial suspensions in analysis buffer (EIA containing 0.5% Tween 20) were mixed with 10 µl of colloidal-gold-labeled antibodies (20 µg/ml) in the wells of a 96-well microtiter plate. After 10 min incubation of the mixture at RT, the strips were inserted into the wells. The capillary migration from the bottom of the sample pad to the absorption pad in the upper position lasted for about 30 min. The signal intensities of the test and control lines were visually estimated.

272

Detection in artificially spiked stools cultures. The equivalent of a pea, corresponding approximately to 1 g of feces from a healthy individual, was diluted in 10 ml of EIA buffer

for the enzyme immunoassay or in 10 ml of EIA buffer containing 0.5% Tween 20 (feces buffer) for the LFI. Overnight cultures in LB broth at 28°C and 37°C of enteropathogenic *Yersinia* and other enterobacteria were adjusted (based on optical density at 600 nm) to 5 x 10⁷ cfu/ml in feces buffer and serially diluted in the same buffer either for EIA or for LFI just before analysis using conditions described above. Exact concentration of bacteria was then determined by enumeration of serial dilutions in EIA buffer.

Results

Production and selection of anti-*Yersinia* mAbs. After fusion of spleen cells with myeloma cells, hybridomas were screened by ELISA for the presence of specific antibodies directed against the bioserotype 2/O:9 and 4/O:3 of *Y. enterocolitica* and the serotypes I and III of *Y. pseudotuberculosis*. As the aim of this study was to obtain antibodies specific of each prevailing species and bioserotypes of *Yersinia* strains, selection of antibodies was performed by differential screening ELISA, using plates coated with different bacteria strains. A first selection of antibodies was achieved using a species/bioserotype screening (for example *Y. enterocolitica* 2/O:9 against *Y. enterocolitica* 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* I and III) and a second one using a genus screening (against other Gram(-) enterobacteria: *E. coli*, *Shigella sonnei* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium). These screenings led to the selection of 4 series of 15, 14, 14 and 17 specific mAbs against *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3, *Y. pseudotuberculosis* I, and *Y. pseudotuberculosis* III respectively.

Combinatorial analyses were performed using biotinylated antibodies as tracer antibodies in a two-site immunometric format by testing (i) their specificities for the genus *Yersinia* compared to other enterobacteria (*E. coli*, *S. sonnei* and *S. enterica*), (ii) their specificities between the two enteropathogenic *Yersinia* species: *Y. enterocolitica* and

300 *Y. pseudotuberculosis*, and (iii) their specificities between different bioserotypes of
 301 *Y. enterocolitica* strains (2/O:9 or 4/O:3 against 1A, 1B, 2/O:5,27) and different serotypes of
 302 *Y. pseudotuberculosis* strains (I, III, V). As shown in Table S1 in the supplemental material,
 303 among the 225 combinations tested, 56 detected *Y. enterocolitica* 2/O:9 but 8 appeared
 304 lacking of specificity with detection of *E. coli* also. For *Y. enterocolitica* 4/O:3 shown in
 305 Table S2 in the supplemental material, only a few combinations (11 out of 169) were positive,
 306 all specific of the expected strain. As shown in Table S3 in the supplemental material, among
 307 the 196 *Y. pseudotuberculosis* I tests, 52 proved to detect the strain but 13 exhibited cross-
 308 reactivity (CR) with unrelated strains like other enterobacteria tested and *Y. enterocolitica*
 309 bioserotype 4/O:3. Finally for *Y. pseudotuberculosis* III shown in Table S4 in the
 310 supplemental material, most of the 289 combinations (265) strongly detected the expected
 311 strain and 16 of those were devoid of specificity with nonspecific detection of the other
 312 enterobacteria tested. In a second time, a second round of testing was performed for the
 313 positive and specific combinations by evaluating their sensitivity using serial dilutions of the
 314 related *Yersinia* strains (data not shown). For each mAbs series (anti-*Y. enterocolitica* 2/O:9
 315 anti-*Y. enterocolitica* 4/O:3, anti-*Y. pseudotuberculosis* I and anti-*Y. pseudotuberculosis* III),
 316 the mAb tracers allowing the best sensitivity (Ye18*, Ye300*, Yps2* and Yps104*) were
 317 chosen for further development.

318

319 **Optimization of the Enzyme immunoassay (EIA).** The 4 mAbs selected for tracer
 320 preparation were labeled with AChE to reduce the EIA steps number and to possibly improve
 321 sensitivity of the tests. Combinatorial analyses using serial dilutions of the related *Yersinia*
 322 strains were performed to determine the capture mAbs providing the best sensitivity in
 323 association with these AChE-labeled mAbs. Four mAbs pairs were finally retained:
 324 Ye4/Ye18* for *Y. enterocolitica* 2/O:9, Ye300/Ye300* for *Y. enterocolitica* 4/O:3,

325 Yps2/Yps2* for *Y. pseudotuberculosis* I and Yps108/Yps104* for the *Y. pseudotuberculosis*
 326 III. The influence of different assay parameters (temperature, centrifugation step at the
 327 beginning of the incubation step, length of incubation) were evaluated, finally leading to an
 328 optimized assay of 3h30 including a centrifugation step as compared to the initial 20h format.

329 Specificity of the immunoassays was checked using a high concentration of enterobacteria
 330 (5×10^7 cfu/ml) cultured at their optimal growth conditions by comparing their related
 331 *Yersinia* to other genera (Fig. 1A) and other species and bioserotype (Fig. 1B). As observed
 332 (Fig. 1A and B), only the *Y. pseudotuberculosis* I EIA exhibited a faint cross reactivity (CR,
 333 calculated as the ratio of absorbance units obtained for non-specific and specific bacteria at
 334 the same concentration $\times 100$) with unrelated *E. Coli* (CR<3%) and some *Y. enterocolitica*
 335 and *Y. pseudotuberculosis* strains (CR<5%). The 3 other EIAs appeared totally specific, even
 336 if the *Y. enterocolitica* 4/O:3 provides a limited signal for this important concentration as
 337 compared to the other EIAs, possibly indicating a difference of sensitivity. Optical signal was
 338 obtained for all mAbs pairs selected.

339 To evaluate both the sensitivity of these EIAs and the possible influence of the bacteria
 340 growth temperature, serial dilutions of the related *Yersinia* strain cultured at two temperatures
 341 (28°C and 37°C) were assayed. All the EIAs allowed sensitive detection in the 10^4 - 10^5 cfu/ml
 342 range. On the other hand as expected, better signals were obtained with a growth temperature
 343 of 28°C for *Y. enterocolitica* 2/O:9, and *Y. pseudotuberculosis* III while surprisingly 37°C
 344 appeared more favorable for *Y. pseudotuberculosis* I (Fig. 2). The signals were not
 345 significantly different for *Y. enterocolitica* 4/O:3 at both temperatures. However, calculated
 346 LoD were close for each of the target whatever the growth temperature as illustrated in Table
 347 3. It is worth noting that for the 37°C temperature, the optimized procedure provided at least a
 348 14-fold increase in sensitivity as compared to the EIA made with the initial conditions.

349

350 **Enzyme immunoassay with artificially contaminated stools cultures.** To validate these
 351 new EIAs, artificially contaminated stools samples were tested. The genus, the species and the
 352 bioserotype specificities were checked as described above (see section Optimization of the
 353 Enzyme immunoassay) using various *Yersinia* (*Y. enterocolitica* 2/O:9, 4/O:3, 1A 1B,
 354 2/O:5,27 and *Y. pseudotuberculosis* I, III and V) and other enterobacteria (*E. coli* BL21, O26
 355 and O55, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Paratyphi A,
 356 Senftenberg and *Erwinia pyrifoliae*). As previously obtained with bacteria in simple EIA
 357 buffer, a specific signal was recovered for *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3,
 358 *Y. pseudotuberculosis* I and *Y. pseudotuberculosis* III with the mAbs pairs Ye4/Ye18*,
 359 Ye300/Ye300*, Yps2/Yps2* and Yps108/Yps104* respectively.

360 When analyzing the signal intensity and the LoDs, the same influence of growth
 361 temperature was observed for the stools samples as previously with samples in EIA buffer. As
 362 shown in Table 3, no clear change in sensitivity was induced by the stools medium, thus
 363 indicating the absence of important matrix effect for the EIAs, except for *Y. enterocolitica*
 364 2/O:9 and *Y. pseudotuberculosis* I EIAs for which the LoDs increased 20 and 35 fold
 365 respectively when bacteria were grown at 37°C.

366

367 **Analysis of the nature of the antigens recognized by the antibodies by western-blotting.**

368 In order to determine if the recognized antigens were protein, samples were treated or not
 369 with Proteinase K prior to western blot (Fig. 3). The immunoblot analysis showed that only
 370 mAb Yps2 on *Y. pseudotuberculosis* I extract recognized a band of approximately 70 kDa
 371 sensitive to Proteinase K treatment, indicating that the mAb Yps2 bound protein epitope
 372 (lanes 7 and 8). For the other mAbs Ye4 and Ye18 on *Y. enterocolitica* 2/O:9 extract, and
 373 Ye300 on *Y. enterocolitica* 4/O:3 extract, Proteinase K treatment did not induce any clear
 374 modification of the recognition. For the mAbs Yps104 and Yps 108 on *Y. pseudotuberculosis*

III extract, only the high molecular band around 100 kDa appeared partially sensitive to Proteinase K treatment with a signal diminution and a shift of the molecular weight to approximately 80 kDa (lanes 9 to 12). Moreover, a typical pattern profile of long chain LPS without ladder was observed on the immunoblot analysis using the mAbs Ye4, Ye18 and Ye300 (lanes 1 to 6) (34). For the mAbs Yps104 and Yps108, another typical pattern was observed with signal for the core LPS and less signal on long chain LPS (lanes 9 to 12) (35). Therefore, all these samples presented a characteristic smear pattern profile of LPSs, indicating that these mAbs presumably interacted with LPSs of their related *Yersinia*.

383

Development of a lateral flow immunoassays (LFI). To set up an even faster and easier handling test, i.e. a LFI, all mAbs pairs displaying a specific signal for enteropathogenic *Yersinia* detection in the previous immunoenzymatic assay were reevaluated during the LFI development. As the format of the test can influence the specificity, we first checked the genus/species/bioserotype specificities, using 5×10^7 cfu/ml (5×10^6 cfu/dipstick) of various *Yersinia* and other enterobacteria (*E. coli* BL21, O26 and O55, *S. sonnei*, *S. flexneri*, *S. enterica* serovars Typhimurium, Enteritidis, Paratyphi A, Senftenberg and *Erwinia pyrifoliae*). Then the sensitivity of the selected specific LFI was evaluated using serial dilutions of the related *Yersinia* strains. Best mAbs combinations for detecting *Y. enterocolitica* 2/O:9 and *Y. enterocolitica* 4/O:3 were Ye4/Ye18* (2/O:9 LFI) and Ye300/Ye300* (4/O:3 LFI) respectively. The mAbs pair Yp7/Yp7* recognizing the serotypes I, II, IV and V of *Y. pseudotuberculosis*, and the mAbs pair Yps103/Yps104* recognizing the serotype III were combined to achieve a single LFI allowing *Y. pseudotuberculosis* detection for serotypes I, II, III, IV and V (Yps LFI). Since the results were similar for all the different LFIs, the results obtained for the 4/O:3 LFI are presented as an illustration (Fig. 4). The different LFIs proved to be as specific as the optimized EIA and no cross reactivity was

400 observed with enterobacteria other than the related enteropathogenic *Yersinia* (see Fig. 4A for
 401 Ye4/O:3 LFI). Although *Y. enterocolitica* O:9 LPS exhibits strong similarity with *Brucella*
 402 spp. LPS (35), no cross-reactivity was observed for the *Y. enterocolitica* 2/O:9 LFI with
 403 *Brucella* strains (*B. abortus* and *B. melitensis*). The Ye4/O:3 LFI and Yps LFI were also
 404 tested with *Brucella* strains and provided the same negative result.

405 The sensitivity obtained for the different LFIs was 5×10^5 cfu/ml and 10^5 cfu/ml for
 406 detection of *Y. enterocolitica* 2/O:9 and *Y. enterocolitica* 4/O:3 respectively (see Fig. 4B for
 407 Ye4/O:3 LFI). LoD of the Yps LFI for *Y. pseudotuberculosis* detection was close to 10^5
 408 cfu/ml for serotypes I, 5×10^5 cfu/ml for serotypes III and IV, 10^6 cfu/ml for serotypes II and
 409 V. As expected, LFIs appear less sensitive than optimized EIA but no difference of sensitivity
 410 between *Yersinia* strains grown at 28°C and 37°C was observed. It is worth noting that for all
 411 LFIs, a specific band was detected for high bacterial concentrations, in the lower part of the
 412 membrane, resulting from bacteria aggregates still recognized by the tracer mAbs but too
 413 large to migrate along the membrane. At lower bacterial concentrations, the intensity of this
 414 band decreased (Fig. 4B).

415 All LFI were then tested with a large number of strains including related *Yersinia* along
 416 with unrelated *Yersinia* and other bacteria. All these related strains were tested at the
 417 concentration of 10 LoD and unrelated bacteria were tested between 5×10^6 and 5×10^7
 418 cfu/ml. For the 2/O:9 LFI, all of the 13 tested strains from the bioserotype 2/O:9 were
 419 detected at 10-LoD (5×10^6 cfu/ml) while there was no detection of 14 tested strains from the
 420 biotype 4/O:3 (Table 1). For the 4/O:3 LFI, all the 14 tested strains from the bioserotype
 421 4/O:3 proved to be positive at 10^6 cfu/ml (10-fold LoD) conversely to 13 tested strains from
 422 the bioserotype 2/O:9 (Table 1). Except for *Y. enterocolitica* 1A/O:3, none of the other
 423 unrelated bacteria were recognized with the 4/O:3 LFI (Table 1). Biotype and serotype of this
 424 1A/O:3 strain was verified before and after the experiment to confirm its characteristics. For

425 *Y. pseudotuberculosis*, the Yps LFI detected 7 out of 32 tested strains from the serotype I at
 426 10^6 cfu/ml (10-fold LoD) and this number increased to 20 out of 32 for a 10^7 cfu/ml
 427 concentration (Table 2). All the strain from serotypes II (10 strains), III (11 strains), IV (10
 428 strains) and V (11 strains) were detected. Moreover, none of the other unrelated bacteria,
 429 including *Y. enterocolitica*, *Yersinia similis* and *Yersinia wautersii*, were detected by the Yps
 430 LFI.

431 A multiplex LFI involving all the mAbs previously selected was designed, aiming to
 432 provide a simultaneous detection of enteropathogenic *Yersinia* (Fig. 5). The sensitivity
 433 obtained with the multiplex LFI for the different bacteria proved to be similar to those
 434 described with the single LFIs.

435

436 **Lateral flow immunoassays with artificially contaminated stools cultures.** As for the EIA,
 437 LFIs were tested with the different bacteria spiked in feces and diluted in buffer before the
 438 analysis. The specificities and sensitivities of the different LFIs were almost not modified in
 439 feces as compared to results obtained in buffer. LoD of the 2/O:9 LFI and 4/O:3 LFI was $5 \times$
 440 10^5 cfu/ml for detection of *Y. enterocolitica* 2/O:9 and *Y. enterocolitica* 4/O:3 respectively.
 441 LoD of the Yps LFI for *Y. pseudotuberculosis* detection was close to 10^5 cfu/ml for serotype
 442 I, 5×10^5 cfu/ml for serotype III and 10^6 cfu/ml for serotype V. Serotypes II and IV were not
 443 tested with artificially contaminated stools cultures. Before the LFI, bacterial samples in feces
 444 buffer were diluted 1:2 in EIA buffer containing 0.5% Tween 20.

445

446 Discussion

447

448 The incidence of enteric yersiniosis caused by the enteropathogenic bacteria
 449 *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* is probably largely underestimated all around the

world. One of the main reasons leading to this underestimation is the difficulty to recover *Yersinia* strains from bacterial flora present in stools samples. Because of their optimal growth temperature of 28°C, the conditions of culture suitable for most enterobacteria using non-selective medium at 37°C for 24 h do not allow an optimal detection of *Yersinia* strains. This detection can be improved using enrichment procedures, but this requires additional time, cost and work. Even if some *Yersinia* selective media were developed, allowing to improve the isolation of *Y. enterocolitica* strains, the growth of *Y. pseudotuberculosis* was inhibited or not tested (36-39). Moreover, these selective media are not yet marketed and consequently, cannot be routinely used by clinical laboratories. Nowadays, CIN can be used for isolation of *Yersinia* species but at their optimal growth temperature of 28°C (40), thus requiring additional device for a clinical laboratory. Although CIN is marketed, this media is not consistently used because of its additional cost. Moreover, CIN inhibits the growth of some *Y. pseudotuberculosis* strains while allowing the growth of non-pathogenic *Yersinia*. Given the lack of rapid and simple methods for diagnosis of enteropathogenic *Yersinia* in human samples, the aim of this study was to develop two sensitive and specific immunoassay formats for the diagnosis of the most frequent bioserotypes of *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*.

We first produced a large set of mAbs against *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* and screened them for their specificity and sensitivity. This selection was achieved for specific detection of each of the four prevailing isolated strains: *Y. enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* serotypes I and III. These mAbs led to the development of a one-step, 3 h 30 EIA with excellent sensitivity and specificity, and a low cost and user-friendly LFI with a good sensitivity and specificity.

As compared to isolation and characterization protocol involving CIN, these two immunoassays offer a great improvement on the duration of *Yersinia* detection. Indeed, the

475 LFI and the EIA allow a characterization of enteropathogenic *Yersinia* in 40 min and 3h30
 476 respectively, while the CIN only permits bacterial colonies isolation in 48h without further
 477 characterization. Moreover, LFI and EIA do not require complex sample preparation and is
 478 thus well suited for clinical laboratory applications. It has been shown that CIN is permissive
 479 for the growth of some bacterial species found in feces samples such as *Acinetobacter*,
 480 *Aeromonas*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Morganella*, *Pseudomonas* and *Serratia* (40, 41).
 481 Usually, the morphology of the colonies can be distinguished between *Y. enterocolitica* and
 482 other bacteria, but colonies of *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans* and *Serratia*
 483 *liquefaciens* look similar to *Y. enterocolitica*, leading to possible misidentifications.
 484 Regarding specificity of our immunoassays, none of the enteropathogenic bacteria usually
 485 searched in stools of patients such as *S. sonnei* and *S. enterica* serovars Typhimurium,
 486 Enteritidis, Paratyphi A or Senftenberg were detected. Moreover, the tests are robust enough
 487 to retain their sensitivity in complex matrices like feces.

488 We developed a highly sensitive EIA with a LoD ranging from 1.2×10^3 to 2.0×10^5
 489 cfu/ml for *Y. enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* serotypes
 490 I and III. For the *Y. enterocolitica* 2/O:9, *Y. enterocolitica* 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis* III
 491 EIAs, better signals were obtained when bacteria were grown at 28°C rather than 37°C. This
 492 result can be explained by the fact that the mAbs used in these EIA recognize LPS whose
 493 production is higher at 28°C *in vitro* (42). For the *Y. pseudotuberculosis* I EIA, the signal and
 494 the LoD were better for bacteria grown at 37°C. Since the mAb used in this EIA was targeting
 495 a protein, this higher temperature possibly enhances its expression at 37°C *in vitro*. When
 496 stools samples were used to mimic clinical samples, the LoDs were slightly or not modified,
 497 except for the LoDs of the *Y. enterocolitica* 2/O:9 and *Y. pseudotuberculosis* I EIAs that was
 498 20 to 35 times higher when bacteria were grown at 37°C.

499 Validation of LFI with a large number of bacteria showed 100% detection for
 500 *Y. enterocolitica* (bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3) and for *Y. pseudotuberculosis* (serotypes II,
 501 III, IV and V). For the serotype I, 62.5% of the strains were detected at 10^7 cfu/ml. It is worth
 502 noting that CIN has been shown to exert an inhibitory effect on the growth of some
 503 *Y. pseudotuberculosis* strains (17) and thus our immunoassays could lead to a better detection
 504 of this species from biological samples.

505 It has been previously reported that colonies of *Yersinia* exhibit a similar aspect after
 506 isolation on CIN (17), making impossible to distinguish between pathogenic and non-
 507 pathogenic strains. We thus tested a large number of non-pathogenic strains of
 508 *Y. enterocolitica* biotype 1A, ubiquitous in the environment and predominant biotype of
 509 *Y. enterocolitica* detected among *Yersinia* isolates from human clinical stools samples in some
 510 European countries (43, 44). We observed that only a single strain out of 11 was detected with
 511 the 4/O:3 LFI. It appeared that this positive strain was of serotype O:3 which possesses the
 512 same LPS than *Y. enterocolitica* 4/O:3. This cross-reactivity can be explained by the epitope
 513 recognized by mAb Ye300 which involved the LPS. It is noteworthy that bioserotype 1A/O:3
 514 is quite unusually recovered from clinical samples (45) and only 4 strains from this
 515 exceptional bioserotype out of 2722 were present in the collection of the French National
 516 Reference Laboratory.

517 Although serotype O:9 shares epitopes with O-antigen of *Brucella* (35), none of the three
 518 *Brucella* strains tested was detected by the 2/O:9 LFI, such as for other LFIs. Our Yps LFI
 519 was also tested with *Y. similis* and *Y. wautersii*, two species recently described, closely
 520 relative to *Y. pseudotuberculosis* and presumably pathogenic for human concerning
 521 *Y. wautersii* (46, 47), and provide negative response.

522 LoD of the LFIs were ranging from 10^5 to 10^6 cfu/ml for detection of the four prevailing
 523 isolated strains: *Y. enterocolitica* bioserotypes 2/O:9 and 4/O:3 and *Y. pseudotuberculosis*

524 serotypes I and III. Moreover, our Yps LFI was able to detect *Y. pseudotuberculosis* serotypes
 525 II, IV and V. Thanks to the high LFI robustness, the corresponding LoDs were identical with
 526 artificially contaminated stools samples.

527 To our knowledge, only one study reported that the load of *Y. enterocolitica* in stools of
 528 infected patients range from 10^5 to 10^8 cfu/g of feces (22). However, no experiment was done
 529 to support this affirmation. Using a procedure common for clinical laboratories, i.e. one pea of
 530 feces (corresponding approximately to 1 g, resuspended in 10 ml of buffer), the present EIA
 531 should clearly be useful, presenting a LoD inferior to this range. If this load of
 532 *Y. enterocolitica* in stools is correct, the LoDs of LFIs are above the lowest limit of 10^5 cfu/g
 533 of feces but the tests should work properly in a large part of the concentration range expected
 534 in biological samples. Because we used stools samples from a healthy individual, dilution was
 535 necessary to obtain liquid samples. It can be interesting to determine if stools samples from
 536 patients without or with a lower dilution can improve these LoDs. When compared to more
 537 selective methods such as CIN or RT-PCR with a LoD $\geq 10^3$ cfu/g of feces, our EIAs and
 538 LFIs provide a very fast and economical detection and can be used by minimally trained
 539 personnel without additional devices. Moreover, our LFIs would be a useful tool to determine
 540 the exact load of enteropathogenic *Yersinia* in stools of diarrheal patients. RT-PCR needs
 541 enrichment step as long as isolation on CIN and acquisition of expensive devices. This time
 542 saving can easily avoid unadapted antibiotic treatments or unnecessary appendectomies.

543 Furthermore, it appears that the LFI can be easily handled under field conditions and
 544 consequently can be used for veterinary applications. First, the serotype O:9 of
 545 *Y. enterocolitica* is often naturally isolated from cows, goats, sheep or pigs but their
 546 antibodies against serotype O:9 cross-react with *Brucella* O-antigen and cause false positive
 547 reactions in brucellosis serological diagnosis test (48, 49). This represents a major economic
 548 problem for stock farmers because suspicion of brucellosis leads to the elimination of the

549 animals according to public health regulations. Our LFI can be used to discriminate between
 550 an *Y. enterocolitica* infection and a *Brucella* infection. Secondly, the bioserotype 4/O:3 of
 551 *Y. enterocolitica* is frequently isolated from pigs in farm or in slaughterhouse, and
 552 consumption of pork meat is associated with *Y. enterocolitica* infections (50, 51). Our LFI can
 553 be used by the meat industry at different levels: on livestock to control the absence of
 554 *Y. enterocolitica* and prevent contamination from positive herds, in slaughterhouses to
 555 exclude contaminated pig carcasses or for epidemiological studies. Additionally,
 556 *Y. pseudotuberculosis* appears to be a recurrent veterinary issue in livestock and zoo animals
 557 with significant economic cost (52). Our Yps LFI can be easily handled under field conditions
 558 and would be useful as control test for the presence of the pathogen.

559 In conclusion, this study is the first description of a very sensitive EIA and of a rapid LFI
 560 test suitable for detection of enteropathogenic *Yersinia* in stools samples which can be helpful
 561 to physicians for the diagnosis of patients. The EIA or the LFI would be useful as a first line
 562 rapid test in the clinical laboratories. They can be a great complementary tool to help clinical
 563 laboratories to focus research of enteropathogenic *Yersinia* on positive stools before
 564 performing the gold standard test for confirmation, i.e. isolation of *Yersinia* with traditional
 565 culture methods. Therefore we need to evaluate our immunoassays in clinical laboratories
 566 conditions with pathogenic stools samples. Furthermore, both immunoassays, especially the
 567 easy to use LFI, have potential to be used for veterinary applications for detection of
 568 *Y. enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis*.

569

570 **Acknowledgments**

571 The authors thank for their technical support Marie-Claire Nevers, Audrey Rouaix and Marc
 572 Plaisance.

573

574 **References**

- 575 1. **Galindo CL, Rosenzweig JA, Kirtley ML, Chopra AK.** 2011. Pathogenesis of *Y.*
576 *enterocolitica* and *Y. pseudotuberculosis* in Human Yersiniosis. *J Pathog*
577 **2011**:182051.
- 578 2. **Rosner BM, Werber D, Hohle M, Stark K.** 2013. Clinical aspects and self-reported
579 symptoms of sequelae of *Yersinia enterocolitica* infections in a population-based
580 study, Germany 2009-2010. *BMC Infect Dis* **13**:236.
- 581 3. **Fukushima H, Matsuda Y, Seki R, Tsubokura M, Takeda N, Shubin FN, Paik IK,**
582 **Zheng XB.** 2001. Geographical heterogeneity between Far Eastern and Western
583 countries in prevalence of the virulence plasmid, the superantigen *Yersinia*
584 *pseudotuberculosis*-derived mitogen, and the high-pathogenicity island among
585 *Yersinia pseudotuberculosis* strains. *J Clin Microbiol* **39**:3541-3547.
- 586 4. **Perdikogianni C, Galanakis E, Michalakis M, Giannoussi E, Maraki S, Tselentis**
587 **Y, Charissis G.** 2006. *Yersinia enterocolitica* infection mimicking surgical
588 conditions. *Pediatric Surgery International* **22**:589-592.
- 589 5. **Kaasch AJ, Dinter J, Goeser T, Plum G, Seifert H.** 2012. *Yersinia*
590 *pseudotuberculosis* bloodstream infection and septic arthritis: case report and review
591 of the literature. *Infection* **40**:185-190.
- 592 6. **Yotsu R, Mii S, Hayashi R, Harada H, Furukawa K, Eto H.** 2010. Erythema
593 nodosum associated with *Yersinia enterocolitica* infection. *J Dermatol* **37**:819-822.
- 594 7. **Guinet F, Carniel E, Leclercq A.** 2011. Transfusion-transmitted *Yersinia*
595 *enterocolitica* sepsis. *Clin Infect Dis* **53**:583-591.
- 596 8. **Fredriksson-Ahomaa M, Korkeala H.** 2003. Low occurrence of pathogenic *Yersinia*
597 *enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological
598 problem. *Clin Microbiol Rev* **16**:220-229.

- 599 9. **Bottone EJ.** 1997. *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. Clin Microbiol
600 Rev **10**:257-276.
- 601 10. **Savin C, Leclercq A, Laurent E, Carniel E, Vaillant V.** 2010. Enquête nationale sur
602 le diagnostic des infections à *Yersinia* entéropathogènes en France métropolitaine en
603 2003. Bull Epid Hebd **29**:307-311.
- 604 11. 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses,
605 Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. European Food Safety Authority
606 European Centre for Disease Prevention and Control.
- 607 12. **Long C, Jones TF, Vugia DJ, Scheftel J, Strockbine N, Ryan P, Shiferaw B,**
608 **Tauxe RV, Gould LH.** 2010. *Yersinia pseudotuberculosis* and *Y. enterocolitica*
609 infections, FoodNet, 1996-2007. Emerg Infect Dis **16**:566-567.
- 610 13. **Sato K, Ouchi K, Taki M.** 1983. *Yersinia pseudotuberculosis* infection in children,
611 resembling Izumi fever and Kawasaki syndrome. Pediatr Infect Dis **2**:123-126.
- 612 14. **Eppinger M, Rosovitz MJ, Fricke WF, Rasko DA, Kokorina G, Fayolle C,**
613 **Lindler LE, Carniel E, Ravel J.** 2007. The complete genome sequence of *Yersinia*
614 *pseudotuberculosis* IP31758, the causative agent of Far East scarlet-like fever. PLoS
615 Genet **3**:e142.
- 616 15. **Jalava K, Hallanvuo S, Nakari UM, Ruutu P, Kela E, Heinasmaki T, Siitonen A,**
617 **Nuorti JP.** 2004. Multiple outbreaks of *Yersinia pseudotuberculosis* infections in
618 Finland. Journal of Clinical Microbiology **42**:2789-2791.
- 619 16. **Vincent P, Leclercq A, Martin L, Duez JM, Simonet M, Carniel E, Yersinia**
620 **Surveillance N.** 2008. Sudden onset of pseudotuberculosis in humans, France, 2004-
621 05. Emerging Infectious Diseases **14**:1119-1122.

- 622 17. **Savin C, Leclercq A, Carniel E.** 2012. Evaluation of a single procedure allowing the
623 isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from
624 human stools. PLoS One 7:e41176.
- 625 18. **Wauters G, Kandolo K, Janssens M.** 1987. Revised biogrouping scheme of *Yersinia*
626 *enterocolitica*. Contrib Microbiol Immunol 9:14-21.
- 627 19. **Wauters G, Aleksic S, Charlier J, Schulze G.** 1991. Somatic and flagellar antigens
628 of *Yersinia enterocolitica* and related species. Contrib Microbiol Immunol 12:239-
629 243.
- 630 20. **Garzetti D, Susen R, Fruth A, Tietze E, Heesemann J, Rakin A.** 2014. A molecular
631 scheme for *Yersinia enterocolitica* patho-serotyping derived from genome-wide
632 analysis. Int J Med Microbiol 304:275-283.
- 633 21. **Lantz PG, Knutsson R, Blixt Y, Al Soud WA, Borch E, Rådström P.** 1998.
634 Detection of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in enrichment media and pork by a
635 multiplex PCR: a study of sample preparation and PCR-inhibitory components. Int J
636 Food Microbiol 45:93-105.
- 637 22. **Zheng H, Sun Y, Lin S, Mao Z, Jiang B.** 2008. *Yersinia enterocolitica* infection in
638 diarrheal patients. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases
639 27:741-752.
- 640 23. **Chanteau S, Rahalison L, Ratsitorahina M, Mahafaly, Rasolomaharo M, Boisier**
641 **P, O'Brien T, Aldrich J, Keleher A, Morgan C, Burans J.** 2000. Early diagnosis of
642 bubonic plague using F1 antigen capture ELISA assay and rapid immunogold dipstick.
643 Int J Med Microbiol 290:279-283.
- 644 24. **Simon S, Demeure C, Lamourette P, Filali S, Plaisance M, Creminon C, Volland**
645 **H, Carniel E.** 2013. Fast and simple detection of *Yersinia pestis* applicable to field
646 investigation of plague foci. PLoS One 8:e54947.

- 647 25. **Nato F, Boutonnier A, Rajerison M, Grosjean P, Darteville S, Guénolé A,**
648 **Bhuiyan NA, Sack DA, Nair GB, Fournier JM, Chanteau S.** 2003. One-step
649 immunochromatographic dipstick tests for rapid detection of *Vibrio cholerae* O1 and
650 O139 in stool samples. Clin Diagn Lab Immunol **10**:476-478.
- 651 26. **Nato F, Phalipon A, Nguyen TL, Diep TT, Sansonetti P, Germani Y.** 2007.
652 Dipstick for rapid diagnosis of *Shigella flexneri* 2a in stool. PLoS One **2**:e361.
- 653 27. **Taneja N, Nato F, Darteville S, Sire JM, Garin B, Thi Phuong LN, Diep TT,**
654 **Shako JC, Bimet F, Filliol I, Muyembe JJ, Ungeheuer MN, Ottone C, Sansonetti**
655 **P, Germani Y.** 2011. Dipstick test for rapid diagnosis of *Shigella dysenteriae* 1 in
656 bacterial cultures and its potential use on stool samples. PLoS One **6**:e24830.
- 657 28. **Grassi J, Frobert Y, Lamourette P, Lagoutte B.** 1988. Screening of monoclonal
658 antibodies using antigens labeled with acetylcholinesterase: application to the
659 peripheral proteins of photosystem 1. Anal Biochem **168**:436-450.
- 660 29. **Pradelles P, Grassi J, Maclouf J.** 1985. Enzyme immunoassays of eicosanoids using
661 acetylcholine esterase as label: an alternative to radioimmunoassay. Anal Chem
662 **57**:1170-1173.
- 663 30. **Ellman GL, Courtney KD, Andres V, Jr., Feather-Stone RM.** 1961. A new and
664 rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem Pharmacol
665 **7**:88-95.
- 666 31. **Grassi J, Frobert Y, Pradelles P, Chercuitte F, Gruaz D, Dayer JM, Poubelle PE.**
667 1989. Production of monoclonal antibodies against interleukin-1 alpha and -1 beta.
668 Development of two enzyme immunometric assays (EIA) using acetylcholinesterase
669 and their application to biological media. J Immunol Methods **123**:193-210.

- 670 32. **Kawaoka Y, Otsuki K, Tsubokura M.** 1983. Serological evidence that *Yersinia*
671 *enterocolitica* lipopolysaccharide produced during growth in vivo resembles that
672 produced during growth in vitro at 25 degrees C. J Gen Microbiol **129**:2749-2751.
- 673 33. **Khreich N, Lamourette P, Boutal H, Devilliers K, Creminon C, Volland H.** 2008.
674 Detection of *Staphylococcus* enterotoxin B using fluorescent immunoliposomes as
675 label for immunochromatographic testing. Analytical Biochemistry **377**:182-188.
- 676 34. **Chart H, Rowe B.** 1991. Purification of lipopolysaccharide from strains of *Yersinia*
677 *enterocolitica* belonging to serogroups O3 and O9. FEMS microbiology letters **61**:341-
678 345.
- 679 35. **Chart H, Cheasty T.** 2006. The serodiagnosis of human infections with *Yersinia*
680 *enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. FEMS Immunol Med Microbiol
681 **47**:391-397.
- 682 36. **Blom M, Meyer A, Gerner-Smidt P, Gaarslev K, Espersen F.** 1999. Evaluation of
683 Statens Serum Institut enteric medium for detection of enteric pathogens. J Clin
684 Microbiol **37**:2312-2316.
- 685 37. **De Zutter L, Le Mort L, Janssens M, Wauters G.** 1994. Short-comings of irgasan
686 ticarcillin chlorate broth for the enrichment of *Yersinia enterocolitica* biotype 2,
687 serotype 9 from meat. Int J Food Microbiol **23**:231-237.
- 688 38. **Van Noyen R, Vandepitte J, Wauters G.** 1980. Nonvalue of cold enrichment of
689 stools for isolation of *Yersinia enterocolitica* serotypes 3 and 9 from patients. J Clin
690 Microbiol **11**:127-131.
- 691 39. **Wauters G, Goossens V, Janssens M, Vandepitte J.** 1988. New enrichment method
692 for isolation of pathogenic *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 from pork. Appl
693 Environ Microbiol **54**:851-854.

- 694 40. **Schiemann DA.** 1979. Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia*
695 *enterocolitica*. Can J Microbiol **25**:1298-1304.
- 696 41. **Head CB, Whitty DA, Ratnam S.** 1982. Comparative study of selective media for
697 recovery of *Yersinia enterocolitica*. J Clin Microbiol **16**:615-621.
- 698 42. **Skurnik M, Bengoechea JA.** 2003. Biosynthesis and biological role of
699 lipopolysaccharide O-antigens of pathogenic Yersiniae. Carbohydrate Research
700 **338**:2521-2529.
- 701 43. **Sihvonen LM, Haukka K, Kuusi M, Virtanen MJ, Siitonen A, group Ys.** 2009.
702 *Yersinia enterocolitica* and *Y. enterocolitica*-like species in clinical stool specimens of
703 humans: identification and prevalence of bio/serotypes in Finland. Eur J Clin
704 Microbiol Infect Dis **28**:757-765.
- 705 44. **Fredriksson-Ahomaa M, Cernela N, Hächler H, Stephan R.** 2012. *Yersinia*
706 *enterocolitica* strains associated with human infections in Switzerland 2001-2010. Eur
707 J Clin Microbiol Infect Dis **31**:1543-1550.
- 708 45. **Sihvonen LM, Jalkanen K, Huovinen E, Toivonen S, Corander J, Kuusi M,**
709 **Skurnik M, Siitonen A, Haukka K.** 2012. Clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*
710 biotype 1A represent two phylogenetic lineages with differing pathogenicity-related
711 properties. BMC Microbiol **12**:208.
- 712 46. **Savin C, Martin L, Bouchier C, Filali S, Chenau J, Zhou Z, Becher F, Fukushima**
713 **H, Thomson NR, Scholz HC, Carniel E.** 2014. The *Yersinia pseudotuberculosis*
714 complex: Characterization and delineation of a new species, *Yersinia wautersii*. Int J
715 Med Microbiol. **304**(3-4):452-63
- 716 47. **Sprague LD, Scholz HC, Amann S, Busse HJ, Neubauer H.** 2008. *Yersinia similis*
717 sp. nov. Int J Syst Evol Microbiol **58**:952-958.

- 718 48. **Chenais E, Bagge E, Lambertz ST, Artursson K.** 2012. *Yersinia enterocolitica*
719 serotype O:9 cultured from Swedish sheep showing serologically false-positive
720 reactions for *Brucella melitensis*. Infection ecology & epidemiology **2**.
- 721 49. **Godfroid J, Nielsen K, Saegerman C.** 2010. Diagnosis of Brucellosis in Livestock
722 and Wildlife. Croatian Medical Journal **51**:296-305.
- 723 50. **Nesbakken T, Eckner K, Hoidal HK, Rotterud OJ.** 2003. Occurrence of *Y-*
724 *enterocolitica* in slaughter pigs and consequences for meat inspection, slaughtering
725 and dressing procedures. Genus *Yersinia*: Entering the Functional Genomic Era
726 **529**:303-308.
- 727 51. **Fredriksson-Ahomaa M, Stolle A, Siitonen A, Korkeala H.** 2006. Sporadic human
728 *Yersinia enterocolitica* infections caused by bioserotype 4/O : 3 originate mainly from
729 pigs. Journal of Medical Microbiology **55**:747-749.
- 730 52. **Quintard B, Petit T, Ruvoen N, Carniel E, Demeure CE.** 2010. Efficacy of an oral
731 live vaccine for veterinary use against pseudotuberculosis. Comp Immunol Microbiol
732 Infect Dis **33**:e59-65.
- 733
734
735
736
737
738
739
740
741
742

FIG 1 Specificity of *Yersinia* optimized enzyme immunoassays. *Yersinia* were grown at 28°C for EIA using Ye4/Ye18*, Ye300/Ye300* and Yps108/Yps104*, and at 37°C for EIA using Yps2/Yps2* (the * indicates the tracer antibody). Other enterobacteria were grown at 37°C. Each strain was used at the concentration of 5×10^7 cfu/ml and was incubated during 3 h. Absorbance was measured at 414 nm after 30 min incubation with Ellman's reagent. YE9 : *Y. enterocolitica* 2/O:9 ; YE3 : *Y. enterocolitica* 4/O:3 ; YE1A : *Y. enterocolitica* 1A ; YE1B : *Y. enterocolitica* 1B ; YE527 : *Y. enterocolitica* O:5,27 ; YPS1 : *Y. pseudotuberculosis* I ; YPS3 : *Y. pseudotuberculosis* III ; YPS5 : *Y. pseudotuberculosis* V ; EC21 : *E. coli* BL21 ; EC26 : *E. coli* O26 ; EC25 : *E. coli* O55, SHS : *Shigella sonnei* ; SHF : *Shigella flexneri* ; SAT : *Salmonella enterica* Typhimurium ; SAE : *Salmonella enterica* Enteritidis ; SAP : *Salmonella enterica* Paratyphi A ; SAS : *Salmonella enterica* Senftenberg ; ERW : *Erwinia pyrifoliae*. (A) Genus specificity of *Yersinia* compared to other enterobacteria. (B) Species and bio/serotype specificities compared to *Y. enterocolitica* strains (2/O:9, 4/O:3, 1A 1B, 2/O:5,27) and *Y. pseudotuberculosis* strains (I, III, V).

FIG 2 Impact of the growth temperature on detection of *Yersinia* by optimized enzyme immunoassays. *Yersinia* were grown at 28°C (black curve) and 37°C (gray curve), 10 fold serial dilutions were performed before a 3 h incubation. (A) EIA Ye4/Ye18* for detection of *Y. enterocolitica* 2/O:9. (B) EIA Ye300/Ye300* for detection of *Y. enterocolitica* 4/O:3. (C) EIA using Yps2/Yps2* for detection of *Y. pseudotuberculosis* I. (D) EIA using Yps108/Yps104* for detection of *Y. pseudotuberculosis* III. Asterisks indicate values that are significantly different: *, $P < 0.05$; **, $P < 0.01$; and ***, $P < 0.001$ between signals.

FIG 3 Recognition of protein and LPS epitopes with anti-*Yersinia* mAbs. Western-blotting with Ye4 (lanes 1, 2) and Ye18 (lanes 3, 4) against *Y. enterocolitica* 2/O:9 (10^7 cfu/well), with

768 Ye300 against *Y. enterocolitica* 4/O:3 (10^7 cfu/well) (lanes 5, 6), with Yps2 against
 769 *Y. pseudotuberculosis* I (10^7 cfu/well) (lanes 7, 8), with Yps 104 (lanes 9, 10) and Yps108
 770 (lanes 11, 12) against *Y. pseudotuberculosis* III (10^8 cfu/well). Bacterial samples in lanes 2, 4,
 771 6, 8, 10 and 12 were treated with Proteinase K. Numbers on the left indicate the molecular
 772 weight markers (in kDa).

773

774 **FIG 4** Ye4O/3 lateral flow immunoassay. Bacteria were grown at 28°C and 37°C. The
 775 bacterial suspensions were incubated for 10 min with colloidal gold-labeled Ye300* mAb,
 776 and the Ye300 dipsticks were then dipped for 30 min into 100 µl of the bacterial suspensions
 777 for upward migration of the liquid. (A) Specificities of the Ye4/O:3 LFI. Each strain was used
 778 at the concentration of 5×10^7 cfu/ml. (B) Sensitivities of the Ye4/O:3 LFI for serial dilution
 779 of *Y. enterocolitica* 4/O:3. Numbers below the dipsticks indicate the number of cfu/ml. †
 780 indicated the last dipstick with a visible signal estimated by eye.

781

782 **FIG 5** Multiplex lateral flow immunoassay. Bacteria were grown at 28°C and used at 10
 783 times the limit of detection. The bacterial suspensions were incubated for 10 min with a mix
 784 of colloidal gold-labeled Ye18*, Ye300*, Yps 104* and Yp7* mAbs, and the LFI were then
 785 dipped for 30 min into 100 µl of the bacterial suspensions for upward migration of the liquid.
 786 The mAbs Ye4 and Ye18 were used for the test line of *Y. enterocolitica* 2/O:9 and
 787 *Y. enterocolitica* 4/O:3 respectively. A mix of Yps103 and Yp7 were used for the test line of
 788 *Y. pseudotuberculosis*.

789

790 **TABLE 1** Specificity and comprehensiveness of the lateral flow immunoassay for *Yersinia*
 791 *enterocolitica* detection. The bacterial suspensions were grown at 28°C for *Yersinia* or 37°C
 792 for other bacteria.

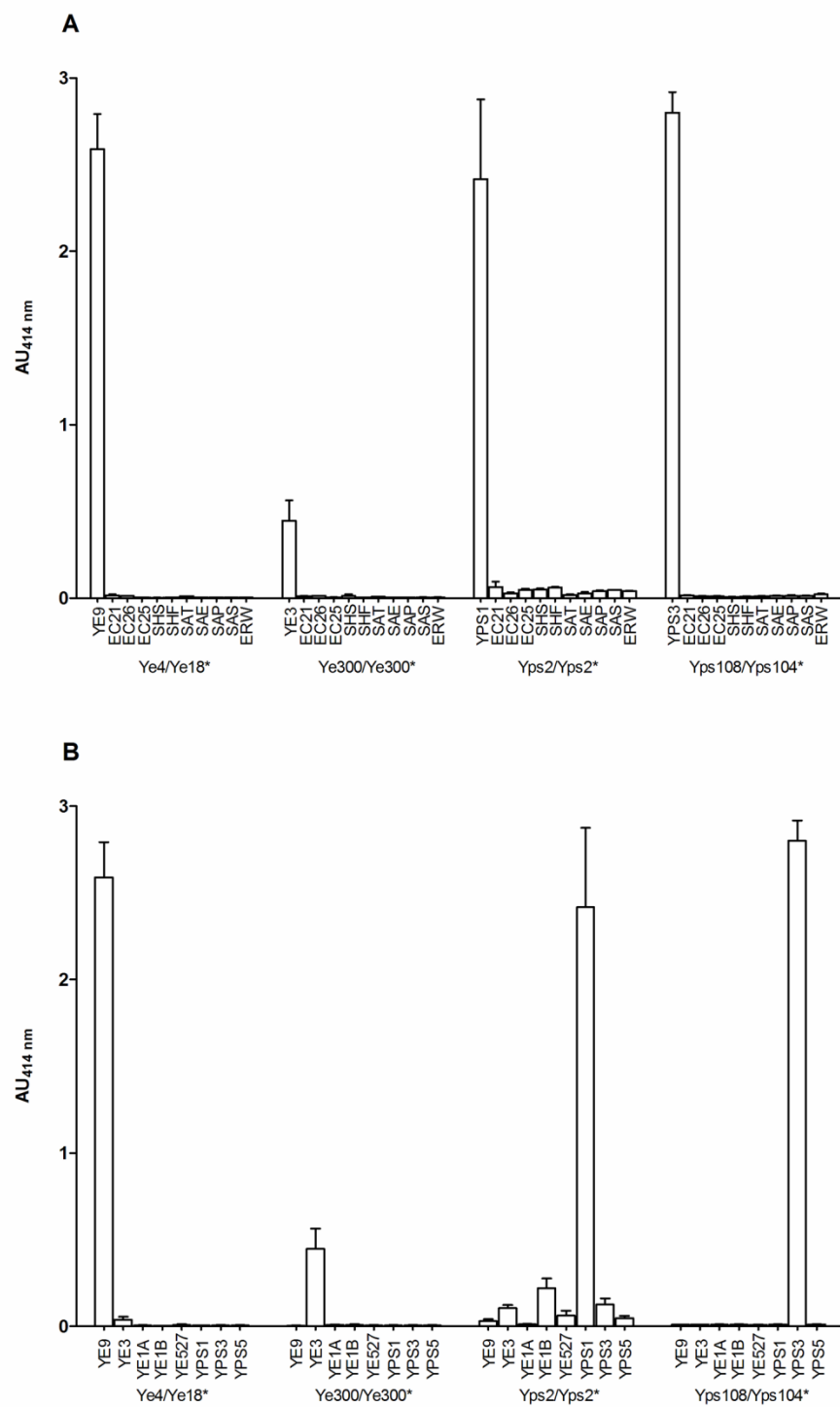
793

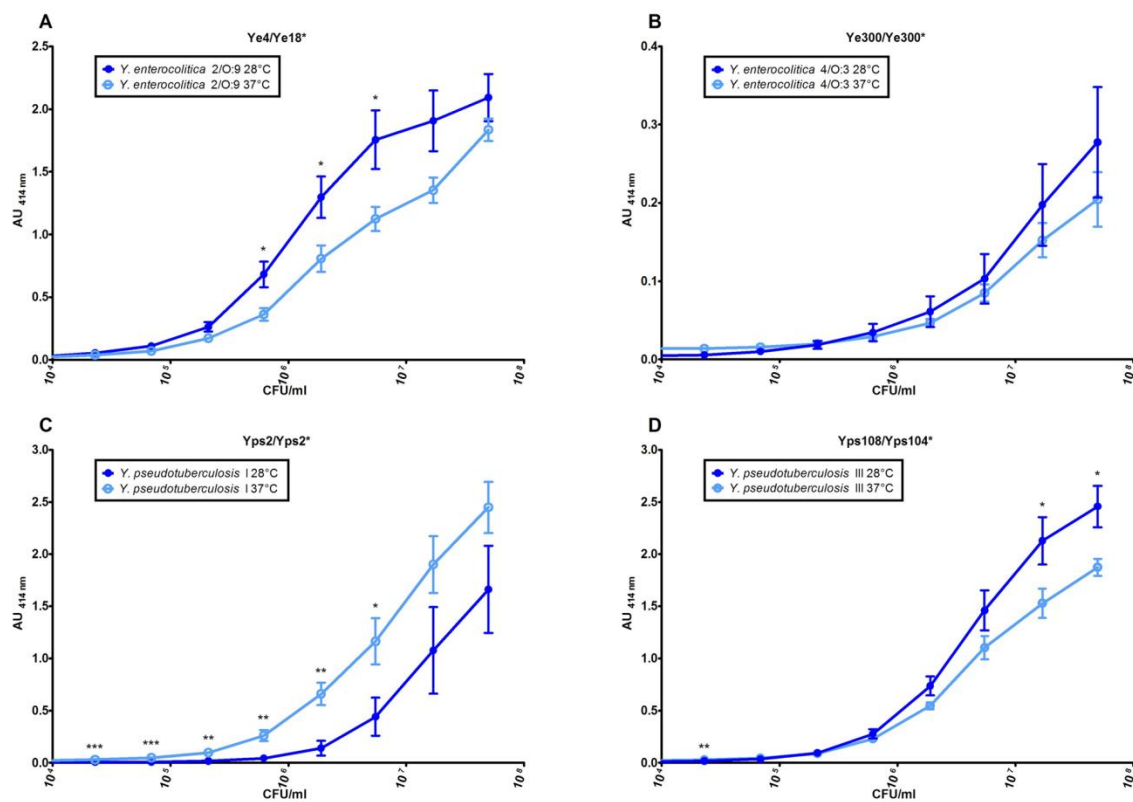
794 **TABLE 2** Specificity and comprehensiveness of the lateral flow immunoassay for *Yersinia*
795 *pseudotuberculosis* detection. The bacterial suspensions were grown at 28°C for *Yersinia* or
796 37°C for other bacteria.

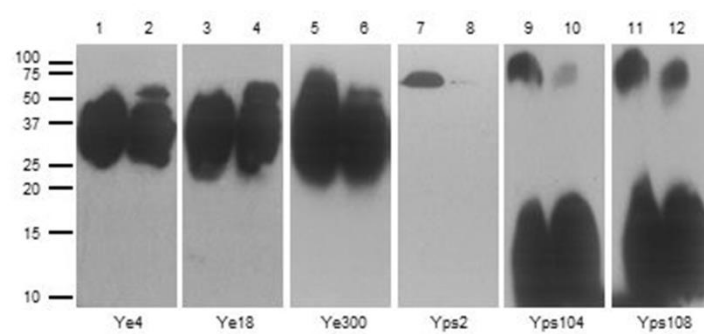
797

798 **TABLE 3** Limits of detection in cfu/ml of the enzyme immunoassays for *Yersinia* detection
799 in EIA buffer (n=3) or in artificially contaminated stools (n=3). *Yersinia* were grown at 28°C
800 and 37°C.

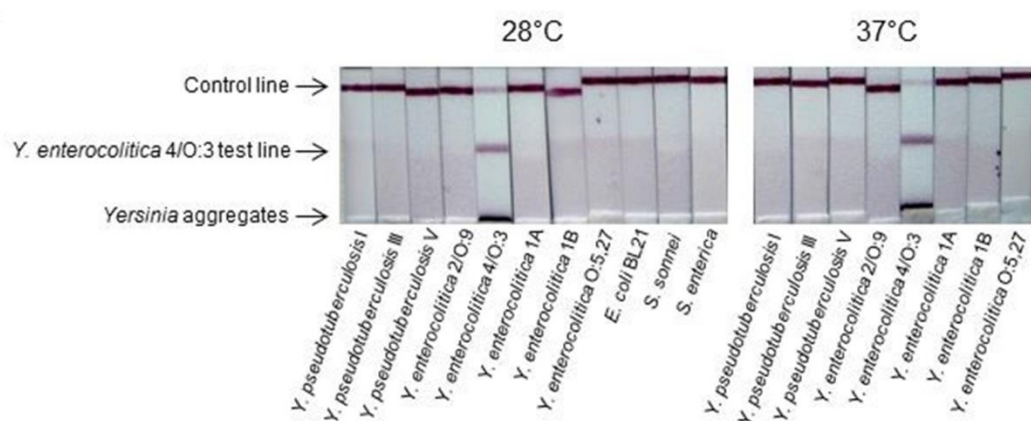
801

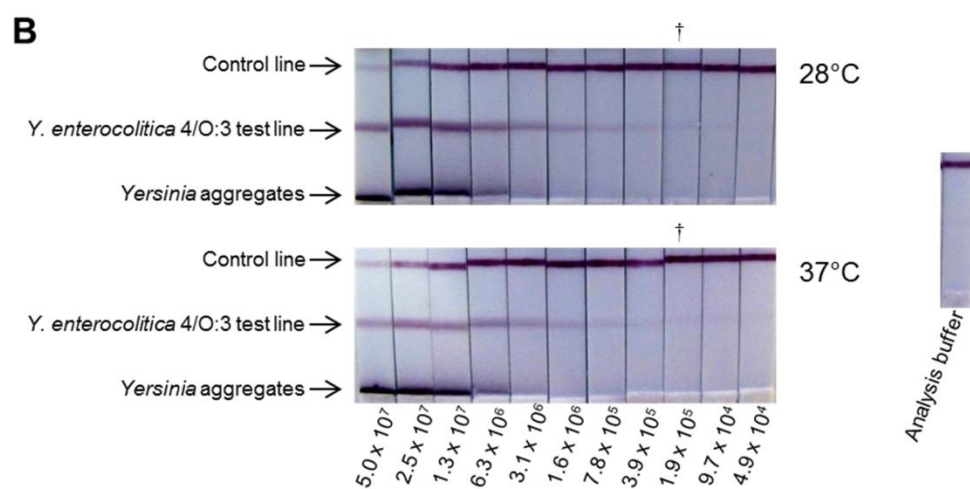


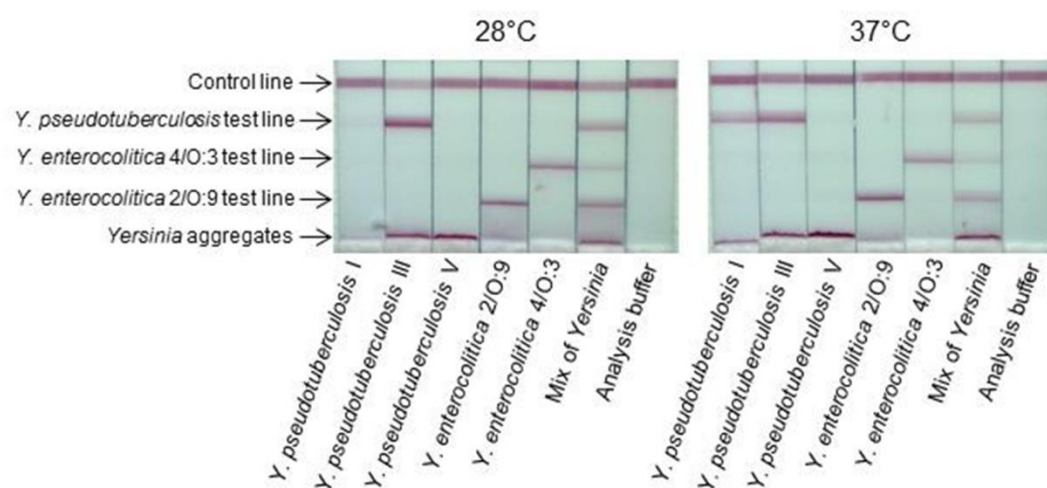




A







1 **TABLE 1** Specificity and comprehensiveness of the lateral flow immunoassay for *Yersinia enterocolitica*
 2 detection. The bacterial suspensions were grown at 28°C for *Yersinia* or 37°C for other bacteria.

Species	Bioserotype or characteristics	Tested concentration (cfu/ml)	Country	Origin	Strain number	2/O:9 LFI	4/O:3 LFI
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/O:9	5×10^6	Belgium	Clinical	IP00383	+	-
			France	Clinical	IP28114	+	-
			France	Clinical	IP29717	+	-
			France	Clinical	IP29193	+	-
			France	Clinical	IP29476	+	-
			France	Clinical	IP29523	+	-
			France	Clinical	IP29944	+	-
			France	Clinical	IP33498	+	-
			France	Clinical	IP33617	+	-
			France	Animal	IP33949	+	-
			France	Clinical	IP34070	+	-
			Netherland	Animal	Ye21	+	-
					IP4294	+	-
	4/O:3	10^6	Belgium	Clinical	IP00134	-	+
			Sweden	Clinical	IP08896	-	+
			Greece	Clinical	IP10393	-	+
			France	Clinical	IP28096	-	+
			France	Clinical	IP28164	-	+
			France	Clinical	IP28983	-	+
			France	Clinical	IP29001	-	+
			France	Clinical	IP29310	-	+
			France	Clinical	IP29534	-	+
			France	Clinical	IP29610	-	+
			France	Clinical	IP33526	-	+
			France	Clinical	IP33550	-	+
			France	Clinical	IP33563	-	+
			France	Clinical	IP34075	-	+
			France	Clinical	IP34120	-	-
			France	Clinical	IP25166	-	-
			France	Animal	IP26014	-	-
			India	Environment	IP26309	-	-
			Italy	Food	IP26618	-	-
			France	Clinical	IP29463	-	-
			France	Clinical	IP29465	-	-
			France	Clinical	IP29469	-	-
			France	Clinical	IP29845	-	-
			France	Clinical	IP33764	-	-
			France	Clinical	IP27875	-	+
	2/O:5	5×10^6	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/NAG	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:7,8-8-8,19	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:10,34	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:5	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:6,30-6,31	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:41,42-41,43	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:12,25-12,26-25,35-35	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/NAG	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:12,25-12,26	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/O:3	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1A/NAG	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	1B/O:8	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
	2/O:5,27	5×10^7	France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
			France	Clinical	IP33592	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	I	5×10^7	Cuba	Animal	IP31629	-	-
	III	5×10^7	France	Clinical	IP33434	-	-
	V	5×10^7	Sweden	Animal	CIP55.88	-	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	5×10^7		Invitrogen	NA NA	-	-
	DH5 alpha	5×10^7		Invitrogen	CIP52.172	-	-
	Serotype O26	5×10^7			CIP52.170	-	-
	Serotype O55	5×10^7			CIP67.63	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	Lysotype 4				CIP106236	-	-
<i>Shigella flexneri</i>	Serotype 2					-	-

<i>Salmonella enterica</i>	Serotype Typhimurium	CIP104474	-	-
	Serotype Enteritidis	CIP105150	-	-
	Serotype Paratyphi A	CIP55.155	-	-
	Serotype Senftenberg	CIP105343	-	-
<i>Erwinia pyrifoliae</i>		CIP106111	-	-
<i>Brucella abortus</i>	Biotype 4	NCTC10503	-	-
<i>Brucella melitensis</i>	Biotype 2	NCTC10508	-	-
	Biotype 3	NCTC10509	-	-

3 + Positive test line estimated by eye.

4 - Negative test line estimated by eye.

5 NA Not applicable.

6 NAG Non-agglutinable.

7 IP: Strains from the collection of the Yersinia Research Unit/National Reference Laboratory.

8 CIP Strains from the Collection of the Institut Pasteur.

9 NCTC Strains from the National Counterterrorism Center.

10

11

12

13

14

15

16

17

18

19

20

21

22

23

24

25

26

27

28

29 **TABLE 2** Specificity and comprehensiveness of the lateral flow immunoassay for *Yersinia*
 30 *pseudotuberculosis* detection. The bacterial suspensions were grown at 28°C for *Yersinia* or 37°C for other
 31 bacteria.

32

Species	Serotype or characteristics	Tested concentration (cfu/ml)	Country	Origin	Strain number	Yps LFI
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	I	10^6	Morocco	Animal	IP30636	+
			Tunisia	Animal	IP30642	+
			Cuba	Animal	IP31629	+
			Poland	Animal	IP32080	+
			Hungary	Animal	IP32414	+
			former Czechoslovakia	Animal	IP32575	+
			Russia	Animal	IP33178	+
		10^7	Hungary	Animal	IP30842	+
			Cuba	Animal	IP31630	+
			Chile	Clinical	IP32654	+
			former Yugoslavia	Animal	IP32665	+
			England	Animal	IP32670	+
			Switzerland	Clinical	IP32730	+
			Switzerland	Clinical	IP32907	+
			France	Clinical	IP32953	+
			Switzerland	Clinical	IP32989	+
			Russia	Animal	IP33242	+
			Russia	Clinical	IP33247	+
			France	Animal	IP33424	+
			France	Clinical	IP33438	+
			former Yugoslavia	Animal	IP32651	-
			France	Clinical	IP32777	-
			Italy	Animal	IP32784	-
			Italy	Animal	IP32800	-
			Switzerland	Clinical	IP32906	-
	II	10^7	France	Clinical	IP32950	-
			France	Clinical	IP32953	-
			France	Clinical	IP33035	-
			USA	unknown	IP33053	-
			France	Clinical	IP33109	-
			France	Clinical	IP33285	-
			France	Clinical	IP33327	-
			France	Clinical	IP33354	+
			Spain New Zealand	Animal	IP32584	+
			Zealand	Clinical	IP32589	+
			France	Clinical	IP32598	+
			France	Animal	IP32870	+
			France	Clinical	IP32951	+
			France	Clinical	IP33006	+
			France	Clinical	IP33047	+
			France	Animal	IP33098	+
			France	Clinical	IP33306	+
	III	5×10^6	Spain	Clinical	IP32666	+
			Italy	Animal	IP32787	+
			Argentina	Animal	IP32976	+
			Australia	Animal	IP32990	+

			France	Animal	IP33049	+
			Argentina	Animal	IP33104	+
			Russia	Clinical	IP33185	+
			Russia	Clinical	IP33250	+
			Argentina	Animal	IP33297	+
			France	Clinical	IP33377	+
			France	Clinical	IP33434	+
IV	5 x 10 ⁶		Japan	Animal	Ryster	+
			Japan former	Animal	IP30103	+
			USSR former	Animal	IP30290	+
			USSR	Animal	IP30291	+
			England	Clinical	IP30298	+
			Denmark	Animal	IP31411	+
			England	Clinical	IP31830	+
			England	Animal	IP31833	+
			France	Animal	IP32687	+
			Russia	Animal	IP33234	+
V	10 ⁷		Sweden	Animal	CIP55.88	+
			Switzerland	Animal	IP32463	+
			France	Animal	IP32699	+
			France	Animal	IP32727	+
			Japan	Unknown	IP32814	+
			Japan	Unknown	IP32817	+
			France	Clinical	IP32821	+
			France	Clinical	IP32843	+
			Germany	Animal	IP33061	+
			Russia	Clinical	IP33278	+
			France	Clinical	IP33397	+
<i>Yersinia similis</i>	O:1c	10 ⁷	Japan	Environment	Kuratani-2	-
	O:6		Germany	Animal	CIP109846	-
	O:6		Japan	Animal	R116	-
	O:7		Japan	Animal	R2091-2	-
	O:11		Japan	Animal	R2031	-
<i>Yersinia wautersii</i>	O:4a		Japan	Clinical	#51	-
	O:4a		Germany	Animal	Y428	-
	O:11		Korea	Environment	WP-930601	-
	O:11		Korea	Environment	WP-931205	-
	O:15		Korea	Clinical	12-219N1	-
<i>Yersinia enterocolitica</i>	2/O:9	5 x 10 ⁷	Belgium	Clinical	IP00383	-
	4/O:3		Sweden	Clinical	IP00134	-
	1A/NAG		France	Clinical	IP33592	-
	1B/O:8		USA	Clinical	CIP80.27	-
	2/O:5,27		United Kingdom	Animal	CIP106676	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3)	5 x 10 ⁷		Invitrogen	NA NA	-
	DH5 alpha			Invitrogen	CIP52.172	-
	Serotype O26				CIP52.170	-
	Serotype O55				CIP67.63	-
<i>Shigella sonnei</i>	Lysotype 4				CIP106236	-
<i>Shigella flexneri</i>	Serotype 2				CIP104474	-
<i>Salmonella enterica</i>	Serotype Typhimurium				CIP105150	-
	Serotype Enteritidis				CIP55.155	-
	Serotype Paratyphi A				CIP105343	-
	Serotype Senftenberg				CIP106111	-
<i>Erwinia pyrifoliae</i>					NCTC10503	-
<i>Brucella abortus</i>	Biotype 4				NCTC10508	-
<i>Brucella melitensis</i>	Biotype 2				NCTC10509	-
	Biotype 3					-

33 + Positive test line estimated by eye.

34 - Negative test line estimated by eye.

35 NA Not applicable.

36 NAG Non-agglutinable.

37 IP: Strains from the collection of the Yersinia Research Unit/National Reference Laboratory.

38 CIP Strains from the Collection of the Institut Pasteur.

39 *Y. wautersii* strain Y428 was kindly provided by the Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz (TLV),

40 Bad Langensalza, Germany.

41 Other *Y. similis* and *Y. wautersii* strains were originated from the collection of the Shimane Prefectural

42 Institute of Public Health and Environmental Science, Matsue, Japan.

43

44

45

46

47 **TABLE 3** Limits of detection in cfu/ml of the enzyme immunoassays for *Yersinia* detection in EIA buffer

48 (n=3) or in artificially contaminated stools (n=3). *Yersinia* were grown at 28°C and 37°C.

	EIA Buffer		Stools	
	28°C	37°C	28°C	37°C
<i>Y. enterocolitica</i> 2/O:9	3.4 x 10 ³	4.9 x 10 ³	3.4 x 10 ⁴	1.3 x 10 ⁴
<i>Y. enterocolitica</i> 4/O:3	7.8 x 10 ⁴	1.4 x 10 ⁵	5.2 x 10 ⁴	7.5 x 10 ⁴
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I	2.0 x 10 ⁵	1.2 x 10 ³	5.4 x 10 ⁶	2.6 x 10 ⁵
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III	1.9 x 10 ⁴	1.1 x 10 ⁴	4.7 x 10 ⁴	3.3 x 10 ⁴

49